

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

ESSAI SUR LA BIOLOGIE DU BACILLE PYOCYANIQUE

PAR C. GESSARD.

J'ai montré, anciennement déjà, l'avantage qu'il y a à cultiver séparément en bouillon et en peptone ¹ le bacille pyocyanique, pour dissocier ses fonctions chromogènes, caractériser ses races et ses variétés et, sous les divers aspects qu'impriment aux cultures les différences de germes et de milieux, reconnaître l'identité de l'espèce. Tel germe qui, en bouillon, ne donne qu'une fluorescence verte (race F), tel autre qui n'y donne pas de pigment (race S), donnent de la pyocyanine dans la solution de peptone. Inversement, un germe peut ne produire que du rouge-brun ² dans ce dernier milieu (variété mélanogène), qui fera de la pyocyanine dans la culture en bouillon. D'autre part, l'expérience suivante, en milieux salins de composition connue, montre à quels éléments simples, dans les milieux complexes précités, se rattache la production de deux de ces pigments. Un germe pyocyanique de la variété mélanogène ne fait que de la pyocyanine dans la solution :

Succinate d'ammoniaque.....	2 grammes
Sulfate de magnésie.....	2 gr, 50
Chlorure de calcium cristallisé.....	1 gr, 25
Eau distillée.....	1.000 c. c.

Dans le même milieu additionné de phosphate de soude ou de potasse bibasique (5 gr.), il ne fait que de la fluorescence.

1. Peptone de préparation spéciale, dont j'ai donné la formule, ces *Annales*, t. VI, 1892, p. 807, et *Bulletin médical*, 1899, n° 53, p. 650.

2. Ce n'est pas le cas avec le germe mélanogène qui m'a servi, et dans la solution de peptone à 2 % : de la pyocyanine s'y montre avant le pigment rouge-brun. Celui-ci apparaît d'emblée, si l'on force la dose de peptone dans la solution. On conçoit, d'autre part, qu'un germe plus énergiquement mélanogène pourrait produire ce dernier effet avec la dose ordinaire.

Dans le même milieu additionné de tyrosine (0,5), il ne fait que du pigment rouge-brun¹.

*
*
*

Mais ni les milieux salins, ni le bouillon et la peptone pris séparément n'entrent dans la pratique courante des laboratoires de bactériologie.

On s'y préoccupe, avant tout, de constituer un milieu banal en rapport avec les indications nombreuses, tirées des sources multiples où puisent les investigations bactériologiques; on vise à réaliser dans ce milieu la plus grande somme d'éléments nutritifs, pour satisfaire aux exigences variées du plus grand nombre d'espèces qui peuvent se rencontrer. Pour cela, bouillon et peptone sont communément associés. Voyons donc comment réagit ce milieu complexe aux différents germes pyocyaniques.

La culture en bouillon peptoné offre trois types, caractérisés par les pigments qui y apparaissent. Ce sont :

- 1^o Culture à pyocyanine seule²;
- 2^o Culture à pyocyanine et fluorescence³;
- 3^o Culture à pigment rouge-brun, qui se montre à la suite ou à l'exclusion des autres pigments⁴.

Trois types de bacilles correspondent aussi à ces trois aspects des cultures en bouillon peptoné. Ils peuvent se caractériser déjà, rappelons-le, dans le bouillon ou la peptone employés séparément. Ce sont :

1. Il faut, pour reproduire cette expérience, ne pas perdre de vue les contingences d'où son succès dépend, et où j'ai insisté dans un travail précédent (ces *Annales*, t. XV, 1901, p. 319). On ne s'attachera donc pas obstinément au chiffre de 2 grammes de succinate d'ammoniaque, bon pour le germe mélanogène qui m'a servi. Mais, par tâtonnement, on cherchera la dose de succinate la plus propre à mettre en relief le triple aspect de cette expérience, très frappante sous la disposition des trois essais parallèles, simultanément ensemencés d'une-égale quantité d'une même culture-mère, de bouillon par exemple.

2. Aboutissant de la race P qui ne donne que de la pyocyanine même en bouillon, et aussi de la race S qui n'y donne pas de pigment, mais dont le caractère spécifique, la production de pyocyanine se retrouve, grâce à la peptone du mélange. (Ces *Annales*, t. V. 1891, p. 70.)

3. Aboutissant de la race A qui fait les deux pigments même en bouillon, et aussi de la race F qui n'y fait que de la fluorescence, mais dont le caractère spécifique, la production de pyocyanine se retrouve, comme il est dit dans la note précédente.

4. Variété mélanogène qui, faute de tyrosine en quantité suffisante dans le bouillon, n'y donne pas de pigment rouge-brun et ne s'y différencie donc pas de la variété pyocyanique ordinaire, mais y peut offrir des caractères d'une des quatre races de cette dernière mentionnées dans les deux notes précédentes.

- 1° Le bacille P, exclusivement pyocyanogène en bouillon ;
- 2° Le bacille A, pyocyanogène et fluorescigène en bouillon ;
- 3° Le bacille mélanogène en peptone.

Tous trois se rencontrent dans les conditions naturelles. Nous aurons à revenir sur cette origine. Voyons d'abord les résultats des tentatives qui ont été faites pour réaliser expérimentalement l'un ou l'autre de ces types.



D'après le sens où s'exerce le plus souvent notre intervention expérimentale, quand elle se confine *in vitro* et ne recourt pas à la collaboration des milieux vivants, nous devons trouver qu'entre nos mains un germe pyocyanique aura perdu quelque une de ses fonctions chromogènes plutôt qu'il n'en aura acquis de nouvelle. En effet, les tentatives dans cette dernière direction sont restées infructueuses. M. Edwin O. Jordan, dans une étude approfondie du bacille pyocyanique, a multiplié sans succès les expériences, en vue de faire naître ou d'accroître le pouvoir pyocyanogène chez des germes qui étaient dépourvus de ce pouvoir ou qui ne l'offraient qu'à un degré restreint. Le même savant n'a pas mieux réussi à donner le pouvoir fluorescigène à un bacille pyocyanique qui ne le possédait pas, malgré une série de cultures dans des milieux particulièrement favorables à la production de la fluorescence¹. J'ai également échoué, de mon côté, quand j'ai entrepris autrefois d'exalter, au regard du bouillon, la fonction fluorescigène d'un germe qui y produisait fluorescence et pyocyanine, et que, dans ce dessein, j'ai fait une longue série de cultures de ce germe dans l'albumine d'œuf, qui est le milieu naturel le plus favorable à l'exercice de cette fonction fluorescigène. Le germe, mis de la sorte en demeure de ne produire que de la fluorescence pendant toute une année, quand il fut reporté au bout de ce temps dans le bouillon, n'y a plus fait dès lors que de la pyocyanine². C'est l'origine de ma race P. On voit qu'elle représente une dégradation de la race A ; elle correspond, comme nous avons dit, au type 1 des cultures en bouillon peptoné.

1. EDWIN O. JORDAN, de l'Université de Chicago. *Bacillus pyocyaneus* and its pigments. *Journal of Experimental Medicine*, 1899, nos 5-6, p. 633 et suivantes.

2. Ces *Annales*, t. V, 1894, p. 70.

En possession du bacille de la variété mélanogène qui, en plus de pyocyanine et fluorescence, produit le pigment rouge-brun, je me suis demandé s'il ne serait pas possible de le dégrader aussi, de lui faire perdre, par exemple, cette dernière faculté, et de le ramener ainsi au type de la variété pyocyanique ordinaire. Pour bien augurer des tentatives dans ce sens, je n'eus qu'à me rappeler le fait d'atténuation progressive du pouvoir mélanogène¹, que j'avais vu spontanément survenir dans un de ces germes, au cours des ensemencements réitérés dont il avait été l'objet. C'est ce germe même que j'ai choisi pour tenter, par un moyen artificiel, d'achever l'œuvre de dégradation déjà en voie d'élaboration spontanée. Le moyen auquel j'ai eu recours, c'est la chaleur, qui m'a déjà servi autrefois à dépouiller de ses fonctions chromogènes le bacille pyocyanique ordinaire. Il m'a suffi de chauffer 5 minutes à 54°² une culture en bouillon du germe mélanogène susdit, pour le rendre inapte désormais à faire le pigment rouge-brun³, même dans les milieux pourvus de tyrosine, qui en fournit la matière première.

Ainsi, à partir de sa plus grande complexité fonctionnelle, qui se manifeste en bouillon peptoné par la production de trois pigments, le rouge-brun, le fluorescent, le pyocyanique, le bacille peut être réduit, par degrés, à ne plus produire dans ce milieu que deux pigments, le fluorescent et le pyocyanique,

1. L'atténuation du pouvoir mélanogène se mesure, je le rappelle, à la quantité de succinate d'ammoniaque dont l'influence est antagoniste, dans la culture en milieu salin, de celle de la tyrosine, et tend à faire prédominer les pigments pyocyaniques ordinaires sur le pigment rouge-brun lié à cette dernière. Plus l'atténuation est poussée, moins est grande la quantité de succinate d'ammoniaque à opposer à la quantité constante de tyrosine de 0,50/00 du mélange.

2. Je ne donne aussi ce chiffre pour valable que relativement à mes expériences et au germe qui m'a servi. A prendre, comme valeurs absolues, les chiffres des températures qui m'ont réussi autrefois pour obtenir des effets de dégradation analogues sur le bacille pyocyanique ordinaire, des expérimentateurs ont échoué dans leurs tentatives pour reproduire ces effets à ces mêmes températures. Le degré de température efficace varie avec le germe, le milieu de culture, etc. Aussi faut-il procéder par tâtonnement, successivement à des températures différentes écartées d'un degré environ, et retenir, pour l'essayer au point de vue des fonctions, le germe qui a subi la température immédiatement inférieure à celle qui abolit la vitalité elle-même. Le chauffage porte chaque fois sur le contenu de la partie effilée d'un tube à ensemencer, qui n'est fermé que par une ouate à la partie supérieure.

3. Le chauffage, dans mon expérience, a fait perdre au germe, du même coup, la fonction pyocyanogène au regard du bouillon : d'où il s'est trouvé bacille pyocyanique ordinaire de race F. Nous retrouverons plus loin mention de la fragilité de cette fonction pyocyanogène dans le bouillon, en comparaison de la fluorescine.

puis un pigment unique, le pyocyanique, d'ailleurs spécifique et sans lequel le bacille pyocyanique ne peut-être identifié ¹.

Quelle importance a chacune de ces fonctions chromogènes, en soi et relativement aux autres ? Quelle place occupe chacune d'elles dans la biologie du bacille pyocyanique et comment peut-on concevoir cette biologie ? C'est ce que j'examinerai dans les lignes qui suivent.

II

Je rappellerai d'abord les circonstances naturelles où se sont rencontrés les types pyocyaniques d'inégal pouvoir chromogène, qui correspondent à ceux que l'expérimentation a mis en œuvre ou réalisés.

Commençons par le bacille mélanogène. Sa fonction chromogène caractéristique est la mieux connue, en tant que ce « phénomène vital a été réduit à une explication physico-chimique bien déterminée ». (CL. BERNARD.) Nous savons que le pigment rouge-brun est dû à la présence de la tyrosine dans les milieux de culture et à la transformation de cette tyrosine par une diastase oxydante, la tyrosinase, que le microbe sécrète et qui est bien connue par ailleurs ¹. Nous pouvons aussi bien dire à quel temps ce pigment rouge-brun est apparu pour la première fois dans la biologie du bacille pyocyanique. Il date

1. Je n'ignore pas que MM. Charrin et Phisalix ont poussé la dégradation encore plus loin, et que, par une série de cultures à la température de 42°,5, ils ont amené le bacille pyocyanique à ne plus produire de pigment, même dans les milieux propices et aux températures eugénésiques. (*Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, t. CXIV, 1892, p. 1365.) Mais je ne crois pas que, en dehors de son intérêt doctrinal, ce fait ait une portée pratique, ni qu'il permette d'inscrire un type nouveau à la suite des trois types de bacilles, caractérisés comme il est dit ci-dessus. Un germe dénué à ce point du caractère spécifique essentiel, la production de pyocyanine, et qui serait rencontré dans les conditions naturelles, ne saurait être revendiqué comme pyocyanique. Dans des conditions expérimentales qu'ils suivaient de près et sur lesquelles ils gardaient la haute main, MM. Charrin et Phisalix ont pu légitimement invoquer, « pour démontrer que ces cultures décolorées étaient bien dues au bacille pyocyanique, les symptômes et les lésions engendrés par l'inoculation aux animaux ». Mais symptômes et lésions ne sont pas à ce point pathognomoniques dans la *maladie pyocyanique* de l'animal ou de l'homme, qu'ils permettent d'identifier, à défaut du pigment spécifique, le bacille pyocyanique. Puisque nous avons la bonne fortune qu'une espèce microbienne possède en propre un caractère si tranché et si facile à reconnaître, nous devons maintenir la prétention rigoureuse que ce caractère soit préféré à tous autres d'interprétation forcément plus personnelle, pour identifier, en toute occasion, les germes de cette espèce.

2. Ces *Annales*, t. XV, 1901, p. 593 et 817.

du cas clinique où M. le docteur Cassin découvrit le nouveau microbe, et de l'étude bactériologique du microbe par M. Radais¹, lequel y reconnut un bacille pyocyanique que différenciait la production de ce nouveau pigment. Le cas est resté isolé dans la science. La singularité du fait, aussi bien que le caractère inédit et la soudaine révélation d'une propriété si curieuse dans une espèce microbienne qui a fait l'objet de si nombreux travaux et qui est d'ailleurs si connue, tout cet ensemble de données m'a conduit à rattacher ce progrès fonctionnel aux circonstances mêmes où le microbe s'est rencontré. J'ai pensé qu'un germe pyocyanique ordinaire s'est trouvé dans des conditions particulières et nouvelles de conflit avec un organisme vivant, un être humain dans l'espèce, d'où lui est venue cette *virulence* nouvelle et d'application si spéciale, si je peux employer cette expression par une assimilation qui me paraît légitime entre ce cas particulier d'accroissement des facultés microbiennes et les autres cas couramment observés où cette expression trouve son habituel emploi.

M. James Kunz² a été le premier, sinon à constater la fluorescence des cultures pyocyaniques, du moins à l'attribuer à l'existence d'un pigment distinct. Une belle fluorescence verte, due au mélange de la pyocyanine et de ce pigment fluorescent (*pyofluorescéine* de l'auteur), forme l'aspect habituel des cultures en bouillon peptoné de la plupart des germes pyocyaniques de diverses provenances. On sait que la production du pigment fluorescent est liée à la présence de phosphate dans le milieu de culture, sans que toutefois l'apparition de la fluorescence accompagne le phosphate aussi souvent que le pigment rouge fait la tyrosine³. Cette fluorescence a pour propriété de disparaître par les acides et d'être rétablie ou exaltée par les alcalis, et de prendre par oxydation, dans les vieilles cultures, une teinte feuille morte comprise entre le brun jaune et l'orangé. La coexistence de la pyocyanine et de la fluorescence dans les

1. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1897, p. 808.

Je dois à l'obligeance de M. le Dr Cassin de pouvoir publier l'observation de ce curieux cas clinique, rédigée par lui et encore inédite. (V. Appendice.)

2. *Corresp. Blatt f. Schweiz. Aerzte.*, t. XVIII, 1888, p. 79.

3. C'est ainsi qu'une coloration rouge accompagne l'oxydation de la tyrosine, que l'agent d'oxydation soit chimique (réactif de Millon) ou biologique (tyrosinase d'origine microbienne ou cryptogamique). J'ai constaté que l'ozone produit aussi la même coloration, mais qui est bientôt limitée par le pouvoir décolorant de ce gaz.

cultures semble le cas le plus fréquent, d'après les recherches bibliographiques auxquelles s'est livré M. E. Jordan¹, dans le même temps qu'il apportait son intéressante contribution à la connaissance du bacille exclusivement pyocyanogène, qui est celui qui va maintenant nous occuper.

J'ai pu rétrospectivement établir² que c'est un germe de ce type qui m'est échu, quand j'ai fait, il y a vingt ans, mes premières recherches sur le microbe des pansements bleus. Si, en effet, il ne m'était pas possible, à l'époque, d'assigner à ce germe son vrai rang dans la biologie du bacille pyocyanique, il n'était pas davantage possible que je méconnusse la fluorescence, si elle était apparue dans le milieu propice qui me servait, car je m'étais initié aux études bactériologiques précisément avec un microbe banal, producteur de ce pigment fluorescent. J'ai pu, grâce à M. Jordan, observer le germe de même race qu'il a étudié (*B. pyocyaneus*, Rush, de son mémoire) et qui a été trouvé dans le corps d'un cobaye, mort à la suite d'inoculation de membrane diphtéritique. Je lui ai trouvé les caractères connus du bacille exclusivement pyocyanogène P : il donne en bouillon peptoné une culture bleue ou verte sans l'éclat des cultures A, laquelle devient brun-rouge³ en vieillissant. Ainsi ce type de bacille pyocyanique se rencontre également dans la nature, et il y serait même moins rare que ces deux exemples isolés ne feraient supposer : récemment M. F. P. Gorham⁴ en signalait la fréquence dans le nez et dans la gorge à côté du bacille à deux pigments.

*
* *

1. *Loco citato*, p. 646.

2. Ces *Annales*, t. V, 1891, p. 75.

3. Brun-rouge bien différent de celui que donne le bacille mélanogène en présence de la tyrosine, et que, d'ailleurs, le mélanogène ne produit pas dans les conditions de milieu qui sont les plus favorables à sa production par le germe P. M. G. W. Boland (*Centralblatt f. Bakteriologie*, t. XXV, 1897, p. 897) en a fait un produit de transformation de la pyocyanine dans les cultures, qui correspond à la pyoxanthose qu'elle donne dans d'autres conditions, et à mesuré, en effet, la décroissance progressive de la pyocyanine en corrélation avec l'accroissement progressif de ce pigment rouge, à mesure que la culture vieillit. Mais j'ai vu ce rouge apparaître par vieillissement des cultures en gélatine glucosée, où le microbe ne produit pas de pyocyanine, mais seulement une coloration jaune ou verdâtre. Je l'ai attribué dès lors à l'oxydation de ce pigment distinct, troisième pigment de mon mémoire de 1890, qui accompagne la pyocyanine dans les milieux et avec les germes qui ne donnent pas de fluorescence.

4. Second Meeting of the Soc. of American Bacteriologists, in Baltimore. *Centralblatt f. Bakteriologie*, t. XXIX, 1901, p. 495.

Nous devons nous demander maintenant : le bacille pyocyanique normal est-il le microbe doué des deux fonctions, pyocyanogène et fluorescigène, d'où le type exclusivement pyocyanogène serait dérivé, comme nous avons vu que c'est le cas dans les conditions expérimentales ; ou bien le bacille, uniquement pyocyanogène d'abord, peut-il acquérir, du fait des circonstances, la propriété de faire de la fluorescence, comme nous avons vu que le bacille producteur des deux pigments a acquis une troisième fonction chromogène dans son séjour au sein d'un organisme vivant ?

Mais notons aussitôt que la fonction fluorescigène n'appartient pas en propre au bacille pyocyanique, qu'elle est commune à un grand nombre d'espèces dont M. Edwin O. Jordan a pu relever cinquante-deux en 1899¹, et que dès lors notre question peut être transformée en la suivante : est-ce qu'un germe fluorescent banal a pu se spécifier et devenir apte à produire de la pyocyanine ; ou, encore une fois, est-ce un germe, seulement pyocyanogène à l'origine, qui est devenu pyocyanogène et fluorescigène ?

Dans l'une et l'autre alternative, puisqu'il s'agit de l'acquisition d'une propriété nouvelle, nous sommes porté à penser qu'il a dû intervenir cette action physiologique d'un milieu vivant, à qui nous n'avons pu, jusqu'ici, trouver d'équivalent dans les ressources de l'expérimentation. D'autre part, si nous admettons que c'est la fonction fluorescigène du bacille pyocyanique qui a pris naissance par ce mécanisme, nous devons trouver même caractère adventice et même origine à cette fonction chez tous les microbes qui en sont pourvus.

Les circonstances, où la plupart de ces microbes ont été rencontrés, me paraissent militer en faveur de cette hypothèse. Car, si les titres, qui ont paru légitimer la création de tant d'espèces distinctes, sont d'inégale valeur et peuvent faire penser qu'une revision sévère réduirait notablement le nombre de ces espèces, la provenance et l'habitat pour chacune d'elles doivent être acceptés comme des titres d'autant plus authentiques qu'ils semblent, dans bien des cas, avoir prévalu sur les autres ou en avoir tenu lieu pour constituer des espèces fluorescentes nou-

1. EDWIN O. JORDAN, The production of fluorescent pigment by Bacteria. *Botanical Gazette*, Chicago, 1899, n° 1, p. 35.

velles. Or, on peut constater que ces germes fluorescents ont été le plus souvent retirés de quelque partie ou produit du corps de l'homme ou des animaux.

Et même, la revision susdite eût-elle pour effet (ce qui dépasse beaucoup ma pensée) de réduire tous les fluorescents aux deux seules espèces si nettement caractérisées par ailleurs, et comme il serait à souhaiter que le fussent toutes les autres, grâce à une fonction spécifique distincte, je veux dire le bacille cyanogène ou du lait bleu et le bacille pyocyanique, on voit assez, par ces deux exemples, que notre hypothèse sur l'origine animale de la fonction fluorescigène ne serait pas infirmée.

*
* *

Des conditions naturelles où nous apparaît le phénomène microbien de la fluorescence, passons aux conditions que nous avons été amené expérimentalement à réaliser ou à adopter de préférence pour entretenir *in vitro* les fonctions chromogènes des microbes. Au premier rang des milieux propices à la fluorescence vient l'albumine telle que l'offre le blanc d'œuf, ce milieu dès longtemps désigné par le développement spontané de la fluorescence verte, qui y a été signalée bien avant qu'on en connût la cause¹. Le bacille pyocyanique doué des deux fonctions chromogènes n'y fait que de la fluorescence. Au contraire, celle-ci cesse de prédominer et tend même à disparaître, à mesure que cette matière albuminoïde est plus différente de ce qu'elle est à l'état naturel. C'est ainsi que, dans le bouillon, la pyocyanine peut se montrer à côté de la fluorescence. Toutefois ce milieu maintient encore l'avantage à la fonction fluorescigène sur la pyocyanogène, au point que cette dernière peut disparaître par le fait seul de la prolongation des cultures en série dans le bouillon, ce qui peut donner naissance à un représentant de la race F, qui ne fait que de la fluorescence dans ce milieu². Enfin, dans la peptone de ma formule, où la matière

1. SCHOENBEIN, 1864.

2. Cette dégradation spontanée d'un germe pyocyanique, qui n'y laisse plus subsister que la fonction fluorescigène, s'observe fréquemment dans les laboratoires, à la suite de nombreuses cultures en série. Et ces germes ainsi modifiés ont été cause d'erreurs, de la part d'observateurs qui en ont eu communication sans avoir suivi le procès de dégradation. Il n'est pas superflu de rappeler que la peptone, particulièrement la peptone gélosée et glycéinée, est le milieu d'élection pour la production de pyocyanine par les germes qui n'en font plus dans les autres milieux. Car peut-on concevoir, sans l'oubli de ce moyen si simple de diagnostic entre le bacille pyocyanique de race F et le bacille fluorescent liqué-

albuminoïde a subi une dégradation plus profonde, la fonction fluorescigène ne se retrouve plus et, seule, la fonction pyocyanogène subsiste.

Mais nous savons désormais que ce n'est pas la matière albuminoïde globale qui favorise la fonction fluorescigène, mais seulement l'élément qui est universellement associé à l'albuminoïde, le phosphate. Et quand nous avons substitué nos milieux salins à ces milieux albuminoïdes, nous avons bien vu, en effet, que, si la fonction pyocyanogène se contente du milieu minéral le plus pauvre, partant le plus rapproché des conditions de la vie saprophytique, la fonction fluorescigène veut en plus, pour se manifester, l'introduction dans ce milieu d'un de ces phosphates, « les plus physiologiques des sels minéraux » (DUCLAUX), et par là témoigne encore de ses relations originelles avec les milieux vivants.

Le rapprochement s'impose ici avec ce qu'on constate, d'autre part, pour la production des toxines, qui est la fonction du bacille pyocyanique dont on peut le moins contester qu'elle s'acquiert ou s'exalte par le passage du microbe dans le corps des animaux vivants. Le bacille, devenu ainsi pathogène, ne donne naissance à ses toxines dans les cultures *in vitro*, que si le milieu est suffisamment riche en principes albuminoïdes¹, et cette fonction particulière, plus exclusive que la fonction fluorescigène, ne s'accommoderait pas, comme celle-ci, des milieux salins phosphatés pour succédanés des albuminoïdes.

*
**

Cette faculté d'acquérir des propriétés nouvelles dans certaines conditions de milieu, qui est une notion bien ancienne pour la virulence et dont la fluorescence me paraît offrir un nouvel exemple, témoigne d'une puissance d'évolution microbienne qu'il est difficile de croire bornée à ces termes. Nous voyons, d'autre part, que le microbe chromogène peut être

fiant, que de longues recherches aient été consacrées à leur trouver des caractères distinctifs dans la forme de liquéfaction de la gélatine, la température de croissance, etc.? Que penser aussi des germes pyocyaniques mis en expérience, sinon des expériences elles-mêmes, dans des recherches qui concluent à l'impossibilité d'obtenir de la pyocyanine et qui en infèrent que la couleur bleue des cultures n'est que celle qui apparaît dans tout liquide légèrement trouble, et est imputable à un phénomène de réfraction de la lumière! M. A. Christomanos a récemment fait justice de ces étranges assertions. (*Zeitschrift f. Hygiene*, t. XXXVI, 1901, p. 258.)

1. CHARRIN et DISSARD, *Mémoires de la Soc. de Biologie*, 1893, p. 182.

amené à ne plus produire aucun pigment ; nous concevons, par suite, la vie comme indépendante de la fonction, et nous sommes conduit à nous demander si elle n'a pas devancé cette dernière ; si, de même qu'il dépouille la fonction chromogène, le microbe ne l'a pas revêtue à un moment donné ; si, en un mot, pour la fonction pyocyanogène elle-même, où nous réduisons la propriété essentielle du bacille pyocyanique, des influences de milieu n'ont pas déterminé son apparition dans un germe primitivement incolore. Mais c'est la question même de l'origine de l'espèce qui se pose ainsi, aussi bien que lorsqu'on discutait jadis la possibilité de la transformation du bacille du foin en bactériidie charbonneuse. Il convient d'autant mieux d'écarter de ces questions les considérations théoriques et de laisser la parole aux faits, que la microbiologie paraît la science qui peut le mieux permettre l'étude expérimentale des questions d'évolution. Aussi je me contente de signaler ce point de vue en passant.

*
* *

Revenons à la fonction fluorescigène, pour rappeler un fait qui me semble en faveur de l'origine animale que je lui attribue. J'ai vu autrefois que cette fonction subsistait seule dans un germe qui faisait primitivement fluorescence et pyocyanine, après que ce germe avait séjourné quarante-huit heures dans le corps d'un lapin¹. Ainsi la fonction s'est maintenue, à l'exclusion de toute autre, dans les conditions qui lui ont donné naissance.

Mais on serait en droit de demander davantage à l'expérimentation, et notamment qu'elle sanctionnât nos vues en faisant apparaître cette fonction fluorescigène dans un germe qui ne la possède pas primitivement. J'ai également une ancienne expérience qui, si elle visait un autre point, ne rentre pas moins dans les données du problème actuel. Un germe exclusivement pyocyanogène, de la race P obtenue par le moyen que j'ai rappelé plus haut, fut introduit dans la circulation d'un lapin ; seulement, ce fut un bacille incolore qui fut retiré du cadavre de l'animal². Mais on peut dire que cette expérience péchait par la base même : elle mettait à contribution un germe dont le caractère unifonctionnel, d'après ses origines, résultait d'un

1. Ce fut une des origines de ma race F.

2. Ce fut une des origines de ma race S.

procès de dégradation¹, au lieu d'être l'attribut primordial du microbe primitif, comme ce devrait être le cas pour le bacille employé à cette expérience.

Mais, quand même nous aurions introduit dans un organisme animal le germe approprié, l'expérience implique, à partir de ce moment, trop d'inconnues, elle procède d'un déterminisme dont nous sommes trop peu maître, pour que nous nous croyions autorisé à faire fonds sur ses résultats, quels qu'ils puissent être. Considérons, d'ailleurs, que l'influence que nous attribuons à la vie parasitaire du microbe sur sa fonction chromogène, ne présente pas un tel caractère de nécessité qu'elle s'exerce, à coup sûr, même dans les conditions qui paraissent les plus favorables. (Cas du bacille isolé par M. Jordan.)

Remarquons enfin combien la manifestation de la fonction mélanogène elle-même, dont l'origine animale est bien avérée, s'est montrée tardive et isolée dans la série infinie des générations pyocyaniques et dans le grand nombre de cas de vie parasitaire du microbe, qui ont pu s'offrir, depuis si longtemps déjà, à tant d'observateurs de tous les pays.

III

La fonction mélanogène du bacille pyocyanique a été manifestement acquise dans un milieu vivant. Par les considérations développées dans les pages qui précèdent, je conclus qu'il en est de même pour la fonction fluoresceigène. Les conclusions de mes études sur le bacille pyocyanique sont les suivantes :

Le bacille pyocyanique a, pour propriété essentielle et spécifique, la production de la pyocyanine. Celle-ci peut manquer, dans certains cas, du fait du milieu. Le milieu spécial avec la peptone permet toujours de la retrouver et, par là, de reconnaître le microbe. Ce pigment est surtout en rapport avec les conditions de la vie saprophytique.

Dans certaines conditions de vie parasitaire dans un orga-

1. M. JAKOWSKI (*Zeitschrift f. Hygiène*, t. XV, 1893, p. 484) a reconnu, en effet, que le succès de mon expérience de la perte du pouvoir chromogène par passage dans le corps des animaux nécessitait préalablement un commencement de dégradation du microbe, qui résultait, dans ses expériences, d'ensemencements répétés en milieu artificiel : des cultures de quatre jours des nos 9 et 12 d'une série perdaient leur pouvoir chromogène par le passage dans les animaux, ce qui n'arrivait pas avec les cultures de même âge du no 3 de la série.

nisme vivant, le bacille pyocyanique peut acquérir la propriété de faire en dehors de cet organisme, *in vitro* :

Un pigment fluorescent, moyennant que le milieu artificiel contienne un phosphate ;

Un pigment rouge-brun, moyennant que le milieu artificiel contienne de la tyrosine ;

Des produits toxiques et pathogènes, moyennant que le milieu artificiel contienne des matières albuminoïdes. (CHARRIN.)

Le bouillon peptoné satisfait à ces exigences diverses. Les cultures du bacille pyocyanique y montrent le plus souvent pyocyanine et fluorescence associées, parce que, comme nous l'avons vu, le microbe doué des deux pouvoirs chromogènes est le plus fréquent, et que le bouillon peptoné offre en quantité suffisante et sous des proportions qui se font sensiblement équilibre les deux éléments dont l'influence se balance en faveur de l'un ou l'autre pigment : le phosphate nécessaire à la fluorescence, la matière azotée qui suffit à la pyocyanine. Cet équilibre est près d'être rompu dans le bouillon simple, et c'est au profit du phosphate ; il en résulte un réactif, peut-on dire, plus sensible que n'est le bouillon peptoné, pour révéler, si faible qu'elle soit, l'inégalité d'aptitude des différents germes relativement à l'une et à l'autre fonction. Et ainsi nous avons pu constituer, au regard de ce bouillon simple, deux types de races qui ne se distinguent pas dans le bouillon peptoné : l'une qui n'y fait que de la fluorescence, F ; l'autre qui n'y fait pas de pigment, S. Mais nous sommes dès lors enclin à nous représenter finalement ces deux races comme étant respectivement des types de bacilles A et P, seulement à pouvoir pyocyanogène atténué, au point que le taux de phosphate du bouillon simple suffit à produire l'inhibition de cette dernière fonction, au profit de la fonction fluorescigène dans le premier cas, F, sous-variété de A ; sans compensation chromogène dans le second cas, S, sous-variété de P. La peptone dans le bouillon peptoné rend la faveur à la fonction pyocyanogène, d'où l'on n'y distingue plus que A et P'. Enfin, en peptone pure, où l'élé-

1. La fonction mélanogène, adventice chez le bacille pyocyanique doit entrer au même titre dans la biologie d'autres espèces microbiennes, comme c'est le cas pour la fonction fluorescigène. A ce point de vue, on devra chercher désormais, pour les divers microbes producteurs de noir, si la coloration des cultures n'est pas en rapport avec la présence de la tyrosine dans les milieux où le noir apparaît.

ment azoté l'emporte de beaucoup, il n'est plus fait que de la pyocyanine par toutes les races.

* *

J'ajouterai quelques réflexions qui me sont inspirées par un travail récent, et que je n'ai connu qu'après la publication de mon mémoire sur le bacille mélanogène.

MM. Otto von Furth et Hugo Schneider¹ se sont attachés à démontrer que c'est la tyrosinase qui donne naissance, dans l'organisme animal, à la mélanine et à tous les pigments analogues. De fait, ils ont constaté la présence de la tyrosinase dans le sang des insectes et d'autres arthropodes, et M. Przibram l'a retrouvée dans les tissus de la poche de noir de la seiche. Ces savants pensent que deux sortes de ferments concourent à la formation des pigments mélaniques dans les tissus vivants : un ferment autolytique qui dégagerait de la matière albuminoïde la tyrosine ou un autre composé aromatique; la tyrosinase ou un ferment analogue qui transformerait ces composés en produits mélaniques. J'ai abouti, de mon côté, à la conclusion que le bacille pyocyanique de la variété mélanogène associe la tryptosine et la tyrosinase pour dégager la tyrosine et l'oxyder, et produire son pigment rouge³ brun dans les milieux albuminoïdes. C'est un nouvel exemple de l'identité d'action physiologique entre les cellules des tissus des êtres vivants, qui ne sont aussi bien que des microbes agrégés et à divers égards dépendants, et les microbes qui sont des cellules libres et autonomes.

1. C'est seulement dans ces limites restreintes que je me trouve en conformité de vue avec les auteurs allemands, dont les travaux ont pour pivot le dualisme : Bacilles α et β , *Bacillus pyofluorescens* et *B. pyocyaneus*. Autrement, le bouillon reste-t-il la base des milieux nourriciers? Au regard de ce bouillon, j'ai quatre germes qui se comportent différemment à travers une longue suite de générations : ils représentent bien quatre races. Elles se sont conservées, en effet, fixes dans leurs caractères, depuis onze ans que je les ai obtenues, et servent, chaque année, aux démonstrations et aux exercices pratiques de l'*Institut Pasteur*. — J'ajouterai, comme contribution à nos connaissances sur la durée de la vitalité des microbes sans spores, que des cultures en bouillon, dans de petits matras Pasteur, que j'avais ensemencées en janvier 1893, furent trouvées.

	Encore fertiles.	Mortes.
A.	11 décembre 1898;	2 février 1899;
F et P.	20 décembre 1896;	3 avril 1897;
S.	4 octobre 1897;	11 décembre 1898.

Ces constatations sont de M. le Dr Binot qui avait ces cultures dans ses collections, et qui en essayait régulièrement l'état de conservation. J'en dois la communication à son extrême obligeance.

2. *Beitragae zur chemischen Physiologie und Pathologie*, t. I, 1901, p. 229.

J'ai, d'autre part, exprimé déjà l'opinion que la fonction fluorescigène, elle aussi, doit se retrouver dans l'organisme de l'homme et des animaux, sans que je préjuge rien sur son rôle dans l'économie ; et j'ai volontiers admis que le sang de certains insectes ¹, d'aspect et de réaction identiques à ceux de la fluorescence d'origine microbienne, offrait la première manifestation, à ma connaissance, de l'existence de cette fonction fluorescigène dans la série animale. Si ces vues se vérifiaient, il ne serait pas indifférent, pour l'idée que nous pouvons nous faire de l'évolution des fonctions microbiennes, qu'un double exemple nous fût ainsi acquis, où l'adaptation du microbe à une fonction nouvelle eût résulté du séjour de ce microbe dans un organisme vivant où cette fonction est normale, et peut-être même (il appartient à des recherches ultérieures d'élucider ce point) dans les parties mêmes de cet organisme où cette fonction s'exerce habituellement.

APPENDICE

Observation d'un sujet chez qui fut trouvé le bacille pyocyanique mélanogène.

PAR M. LE D^r CASSIN.

Au mois d'août 1893, au cours de manœuvres et en saut d'obstacles, X..., officier de cavalerie, 39 ans, a la jambe droite violemment froissée entre le flanc de son cheval et celui d'un camarade.

Au débotter, il constate une meurtrissure sans plaie, produite par les boutons de la culotte, sur la face externe du mollet ; le lendemain, large ecchymose dans cette région, sensation de douleur profonde, mais pas d'interruption de service.

A quelque temps de là, il se découvre, par hasard, dans la zone contuse, dont l'aspect était normal, une induration « comme un furoncle » ; il s'ouvre sans avoir été douloureux (décembre 1893). Puis, autour du premier bouton, il s'en forme de nouveaux qui, comme lui, s'indurent et s'ulcèrent sans réaction ; le médecin du corps prescrit un pansement à l'iodoforme et de l'iodure de potassium à l'intérieur, à continuer pendant plusieurs mois ; il défend le port de la botte, par conséquent l'exercice du cheval.

En mai 1896, la situation demeurait stationnaire, notre officier se résigne à un mois de repos absolu, dont l'effet salutaire est immédiat ; mais, impatient et actif, il reprend son service avant la guérison complète et les plaies à peine cicatrisées s'ouvrent à nouveau.

1. RAPHAEL DUBOIS, *Les Élatérides lumineux*, 1886, p. 217-218.

En juillet et août, cure à la Bourboule sans résultat; de nouvelles indurations se montrent et s'ulcèrent au-dessus de la cheville, sur la tête du péroné.

Pendant l'automne, les traitements les plus variés sont mis en œuvre; le malade garde un repos relatif, fait toujours quelques pas, sort en voiture; la diffusion se poursuit, mais les lésions primitives demeurent stationnaires.

Le malade se confie à mes soins le 2 janvier 1897.

C'est un homme de belle apparence, grand, blond, bien musclé, mais à peau fine et sèche, presque ichthyosique. Il n'accuse aucune infection antérieure, ni syphilis, ni alcoolisme; il est marié, a trois enfants vivants, sa femme n'a jamais eu de fausses couches; issu d'une nombreuse famille, il a encore son père; la mère est morte à la ménopause (?), une de ses sœurs a été enlevée par la tuberculose pulmonaire à 24 ans.

Malgré la longue période d'inactivité qu'il traverse, sa santé générale est demeurée bonne; sommeil, digestion, état des forces, tout est normal: les urines examinées à plusieurs reprises n'ont jamais donné de sucre ni d'albumine.

La seule circonstance qui, à son avis, a pu altérer sa constitution, est la grippe dont il a souffert pendant l'hiver 1894-1895, celui qui a précédé l'accident des manœuvres. Plusieurs mois durant, il eut des rhumes, de la fièvre par accès, des sueurs profuses au réveil, de l'amaigrissement à inquiéter son entourage; très énergique, il se traita par quelques doses de quinine et l'activité. De fait, rien ne restait de cette alerte, l'auscultation du cœur et des poumons était normale; l'examen viscéral le plus minutieux demeurerait négatif.

Du côté de la jambe droite, voici ce qu'on observait: la face externe du mollet droit, de la tête du péroné à la malléole, de la crête tibiale à la crête péronière, offrait une série d'ulcérations d'âges divers, de dimensions différentes, mais de type uniforme; on en comptait une douzaine.

C'étaient des plaies sans croûtes, de contour régulier, rond ou ovalaire; les bords étaient plats, frangés et flottants, décollés dans une zone étroite qui offrait une couleur violacée.

Le fond de la perte de substance ne dépassait pas le derme muqueux, il était rouge granuleux dans les vieilles lésions, grisâtre dans les récentes, sans induration sous-jacente. Elles s'échelonnaient sans contact immédiat, plus pressées à la partie moyenne de la face externe du mollet où siège l'ulcération primitive, large comme une pièce de cinq francs, clairsemées à la périphérie, où leurs dimensions sont plus petites, de 1 à 2 centimètres de diamètre.

Les intervalles de peau intacte laissés entre elles offrent une teinte saumonée, fondue avec la zone violacée des bords décollés.

Cette peau est souple, élastique, sans infiltration œdémateuse ou scléreuse; mais par place, à la périphérie, on trouve dans son épaisseur ou au-dessous d'elle des nodosités du volume d'un pois, qui sont, au dire du malade, l'amorce de futures ulcérations.

Elles n'aboutissent pas toutes, les unes se flétrissent sans s'ouvrir, les autres évoluent sans qu'il soit possible de prévoir leur destinée; et cepen-

dant, il lui a semblé que les indurations les plus rapprochées des ulcères sont celles qui se transforment en plaies nouvelles.

Nous constatons deux petites gommes semblables à la région supra-malléolaire, trois autres à la partie condylienne extérieure de la cuisse; les premières évolueront par la suite comme nous l'indique l'observation du sujet, les secondes se résorberont en laissant une rétraction dermique passagère.

Dans toute la région lésée, il n'y a pas trace d'inflammation, c'est-à-dire de réaction locale: pas de rougeur œdémateuse, pas de trainée lymphangitique, ni d'engorgement ganglionnaire. La sécrétion des plaies est peu abondante, c'est une sérosité louche, filante et gommeuse.

Point de varices apparentes; l'exploration des diverses sensibilités nerveuses affirme leur intégrité.

La jambe et les plaies sont soigneusement débarrassées, pendant trois jours consécutifs, de toutes traces de substances antiseptiques: à cet effet, on use d'eau stérilisée en lavages et pansements humides. Alors seulement on entreprend les recherches bactériologiques: on ensemence la sécrétion des plaies en divers milieux et on l'inocule aux animaux.

Mais terminons l'étude clinique avant de donner ces résultats.

Quarante-cinq jours de repos absolu au lit, des pansements rares à l'iodoforme et, lorsque les bords et le fond des ulcérations demeuraient atones, quelques attouchements à la mixture de Lanfranc suffirent à amener une cicatrisation complète.

Protégé par le port d'un bas élastique, notre officier put reprendre sa carrière et depuis lors la guérison ne s'est pas démentie. Il a eu deux autres enfants, affectés comme les trois aînés de « croûtes de lait » tenaces, mais n'ayant, ni les uns ni les autres, de stigmates d'hérédosyphilis.

Revu cinq ans après — février 1902 — le membre offre l'aspect suivant: sur un fond fauve clair, des taches blanches, luisantes, cerclées d'un liseré ardoisé, révèlent les anciennes ulcérations de la partie externe du mollet: le derme est souple, résistant, l'épiderme squameux et fendillé; en somme, la guérison paraît complète et définitive.

Je donne ici la liste des antiseptiques qui, au cours de ce long traitement d'une année, furent appliqués, en pansements secs ou humides, sur les ulcérations, le professeur Charrin ayant émis l'idée que peut-être l'introduction dans les gommes ulcérées de quantités notables de divers antiseptiques est la cause de la création de la race spéciale, de même qu'il a vu autrefois, avec le professeur Guignard, que le mélange des antiseptiques au bouillon permettait de modifier les formes et les fonctions du microbe. Ce sont: aristol, iodoforme, salol, calomel, sous-nitrate de bismuth, charbon, acides phénique et borique, sublimé en solutions aux titres usuels, emplâtres de Vigo et de diachylon simple.

L'étude bactériologique a été faite en collaboration avec M. le Dr Troussaint, médecin-major.

Le résultat des ensemencements des produits de sécrétion dans tous les milieux usités a été le développement d'un bacille unique à l'état de pureté, dont la culture montrait, dès le second jour, la fonction chromogène carac-

téristique : coloration rouge acajou qui vire en deux ou trois jours au noir encre de Chine.

L'inoculation des produits de sécrétion, dilués dans de l'eau distillée, sous la peau et dans le péritoine de deux cobayes, ne provoque aucun trouble de la santé chez ces animaux; trois mois après, ils sont sacrifiés et trouvés sains.

L'inoculation des produits de culture aux lapins a constamment déterminé une infection généralisée, plus ou moins rapidement mortelle suivant la dose et la porte d'entrée.

La diarrhée avec hypothermie progressive était l'expression habituelle de l'infection chronique, les formes aiguës étant plus variées comme symptômes. Dans les deux cas, on avait le type de l'infection générale avec présence du bacille pathogène dans le sang, les exsudats, les organes lésés. L'activité des produits augmentait avec les passages, et nous en étions arrivés à un virus d'une activité telle qu'un demi-centimètre cube de culture de cinq jours en bouillon peptoné glyciné, déposé dans la veine auriculaire d'un fort lapin, tuait l'animal en trois jours avec exsudats hémorragiques, congestions viscérales multiples. Les produits microbiens stérilisés par la chaleur, ébullition à 100° pendant une heure, déterminaient les intoxications lentes avec diarrhée, amaigrissement extrême et hypothermie, identiques aux infections chroniques.

Chez le cobaye, il fut impossible de déterminer des accidents mortels : il se formait toujours au point d'inoculation un foyer caséux dont l'ouverture se cicatrisait rapidement.

Tous ces caractères rapprochaient ce microbe du bacille pyocyanique mais il était toujours impossible d'obtenir la production caractéristique de pyocyanine. C'est alors que, par l'intermédiaire du professeur Charrin, le microbe fut confié à M. Radais, qui l'identifia définitivement comme bacille pyocyanique d'une variété nouvelle. (*Soc. de Biologie*, 24 juillet 1897.)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ET DE LA NATURE DES MÉLANGES **DES TOXINES AVEC LEURS ANTITOXINES**

PAR J. DANYSZ.

Si la question du mécanisme de l'immunité contre les microbes pathogènes peut être considérée aujourd'hui comme définitivement résolue, il n'en est pas de même pour l'immunité antitoxique.

Les travaux de M. Metchnikoff et de ses nombreux élèves ont démontré d'une façon indiscutable que, dans l'immunité passive contre les microbes, le rôle du sérum immunisant consiste non pas dans la destruction du microbe par le sérum spécifique, mais dans le changement, par l'intermédiaire de ce sérum, de la chimiotaxie négative en chimiotaxie positive qui conduit toujours à la phagocytose, c'est-à-dire à la digestion des microbes dans l'intérieur des leucocytes.

Et comme il avait été démontré, d'autre part, qu'il n'y a pas d'immunisation et de formation de sérum antimicrobien sans phagocytose, il fallait bien en conclure que c'est aussi les leucocytes qui fabriquent l'immunisine.

Il était donc tout naturel d'attribuer aux leucocytes un rôle analogue dans l'immunité antitoxique passive et active, mais, comme il n'est guère possible de suivre dans l'organisme une toxine, l'intervention des leucocytes est, dans ce cas, très difficile à mettre en évidence.

On ne sait pas ce qu'une dose immunisante de toxine devient dans l'organisme, parce que, injectées en doses immunisantes, les toxines ne produisent aucune réaction appréciable, et l'étude des lésions produites par des doses pathogènes ne peut rien nous apprendre à ce sujet, parce que rien ne nous indique qu'en doses immunisantes les toxines agissent sur les mêmes éléments et de la même façon qu'en doses pathogènes.

Il semblait que la découverte du phénomène de fixation *in vitro* de certaines toxines par certains tissus permettrait de

résoudre le problème de la production des antitoxines et du mécanisme de l'action immunisante de ces substances, mais les travaux faits dans cette direction n'ont donné jusqu'à présent que des résultats contradictoires qu'il est impossible de réunir en un ensemble simplement logique.

Ainsi, on sait, depuis Wassermann et Takaki, que la substance nerveuse broyée fixe la toxine tétanique, et que la ricine est fixée par les éléments du sang (Jacoby, Rhens) mais pendant que la toxine tétanique fixée est inactive pour les animaux, la ricine fixée par les hématies ou les leucocytes est tout aussi pathogène que la ricine normale libre.

Dans le premier cas, c'est la toxine qui est détruite par les leucocytes : dans l'autre, c'est la substance fixatrice ; l'intervention des leucocytes aboutirait donc, dans les deux cas, à des résultats contraires, et les deux faits pris ensemble ne peuvent nous fournir aucun renseignement positif sur la formation des antitoxines.

Ces deux faits indiquent, par contre, d'une façon indiscutable, qu'il n'est pas possible d'assimiler, avec M. Ehrlich, les substances fixatrices aux antitoxines. Les expériences qui suivent nous montreront en effet que les antitoxines proprement dites, fixées aux toxines, ne disparaissent jamais ni *in vitro* ni *in vivo* : un mélange inactif de toxine et d'antitoxine ne redevient jamais spontanément actif quand on le conserve dans un verre ou quand on l'injecte à un animal sensible, tandis que la substance qui fixe la toxine tétanique disparaît toujours *in vitro*, et que la substance fixatrice de la ricine disparaît *in vivo*.

Il est donc peu probable que des recherches continuées dans cette direction puissent jamais nous donner des renseignements utiles sur le mécanisme de l'immunisation antitoxique, d'autant plus que l'on ne connaissait encore que d'une façon bien imparfaite la nature des composés que les toxines forment avec leurs antitoxines et la nature de l'action que ces deux substances exercent l'une sur l'autre.

Avant d'entreprendre l'étude de la formation des antitoxines, il nous a donc semblé nécessaire de nous renseigner sur ce dernier point, et dans les chapitres qui suivent nous exposons les résultats des expériences entreprises dans ce but :

I

Nos expériences portent principalement sur les propriétés des mélanges de ricine et d'antiricine.

La solution de ricine dont nous nous sommes servi avait été préparée par la méthode indiquée par Gonzales Cruz¹ : trituration des graines de ricine décortiquées (R. de Zanzibar), dégraissage par le chloroforme, lavage par l'alcool absolu, ensuite séchage du produit lavé et dissolution dans l'eau physiologique. 1 c. c. de cette solution de ricine contenait environ 500 doses mortelles en 4 jours pour cobayes de 300 à 400 grammes, et 1,000 doses mortelles pour lapins.

Le sérum antiricinique avait été obtenu par l'immunisation d'une chèvre. Après une première série d'injections (de notre solution de ricine) 1 c. c. du sérum de cette chèvre neutralisait l'action de 0,5 c. c.; plus tard, après une nouvelle série d'injections, 1 c. c. et enfin 2 c. c. de notre solution de ricine, c'est-à-dire 1,000 doses mortelles pour cobayes.

Quand on mélange la ricine avec l'antiricine en proportions différentes, on remarque que le liquide se trouble toujours immédiatement et que, le plus souvent, il se forme un précipité; mais on constate aussi que le temps de la formation de ce précipité varie beaucoup dans les différents cas. On trouve même des proportions dans lesquelles les deux substances mélangées ensemble ne donnent pas de précipité du tout.

Ainsi, en mélangeant par exemple 1 c. c. de notre solution de ricine avec 0,85 c. c. de sérum antiricinique, on obtient un précipité volumineux en 2 heures, et un liquide, surnageant sur ce précipité, parfaitement clair; tandis que le mélange de 1 c. c. de ricine avec 0,40 c. c. de sérum devient rapidement opalescent, mais ne donne qu'un dépôt à peine appréciable au bout de plusieurs jours. Pourtant, le mélange de 0,50 c. c. de ricine + 0,40 c. c. de sérum donne lui aussi, en 2 heures, un précipité volumineux qui ne se redissout pas dans un excès de ricine.

En préparant une série suffisamment étendue de ces mélanges dans lesquels les rapports entre les quantités de ricine et d'antiricine varient entre 1/100 et 100/1, on trouve toujours une proportion pour laquelle les deux substances forment le plus rapi-

¹ *Annales d'hygiène publique et de médecine légale*, 1898.

dement le précipité le plus volumineux et, des deux côtés de cet *optimum*, deux séries de mélanges dans lesquels les temps de la formation des précipités n'augmentent pas régulièrement, mais par zones qui se suivent d'une façon très irrégulière.

Ainsi, par exemple, après une zone où les temps de la formation d'un dépôt augmentent assez régulièrement de 2 à 24 heures, on trouve une zone où un dépôt très léger ne se forme qu'après 8 jours, et ensuite encore une zone où un dépôt plus volumineux que dans la zone précédente se forme déjà au bout de 48 heures.

Nous ne pouvons pas nous attarder à ces irrégularités qu'il ne nous est guère possible d'expliquer pour le moment : nous verrons aussi plus loin quelle est l'action de ces mélanges en proportions diverses sur les animaux ; ce qu'il importe de faire ressortir ici avant tout, c'est d'abord le fait que, pour donner un précipité, la ricine et l'antiricine doivent s'imprégner ou se fixer mutuellement en proportions déterminées, et qu'il y a un *optimum* de proportions dans lesquelles les deux substances mélangées ensemble se fixent et donnent le plus rapidement le précipité le plus volumineux ; et ensuite cet autre fait que, mélangées en d'autres proportions, elles ne donnent pas de précipité du tout ou un précipité relativement peu volumineux.

Tels qu'ils sont, ces deux faits nous indiquent déjà d'une façon évidente que, s'il y a pour la ricine et l'antiricine un *optimum* de fixation ou d'équilibre, ces deux substances ne se fixent pas seulement dans ces proportions *optima* pour former un composé unique, mais qu'elles peuvent se fixer en plusieurs proportions différentes, et former une série de composés dans lesquels l'une des deux substances est partiellement imprégnée par l'autre par rapport à cet *optimum*.

Si par exemple 1 c. c. de ricine + 0,85 c. c. d'antiricine donnent 100 volumes du composé le plus stable ou le mieux fixé, 1 c. c. de ricine + 0,425 c. c. de sérum ne donneront pas 50 volumes du même composé et 50 volumes de ricine libre, mais 100 volumes d'un composé dans lequel la ricine sera, par rapport au composé précédent, à moitié imprégnée par l'antiricine.

Le précipité qui se forme quand on mélange une solution de ricine avec un sérum antiricinique en proportions *optima* est certainement trop volumineux pour que l'on puisse le considérer

comme exclusivement constitué par la ricine et l'antiricine contenues dans les liquides, ainsi que l'a déjà fait justement remarquer M. Jacoby¹.

Pourtant, un sérum qui ne contient pas d'antiricine ne précipite pas par la ricine, et le précipité qui se forme dans un mélange en *proportions optima* contient toute la ricine et l'antiricine qui se trouvaient dans le liquide. Il est donc certain que si le précipité contient d'autres substances en dehors de la ricine et de l'antiricine, sa formation est une fonction exclusive de ces deux substances.

II

Quand on essaie l'action du mélange de ricine et d'antiricine en *proportions optima* sur les animaux, on constate qu'il est inoffensif pour les lapins et pour les cobayes, mais on constate aussi qu'il n'est pas complètement neutre.

Au mélange de 1 c. c. de ricine + 0,85 c. c. de sérum, on peut encore ajouter 0,01 c. c. de ricine sans le rendre pathogène pour le cobaye, et il faut y ajouter à peu près 0,2 c. c. de ricine (100 d. m.) pour tuer le cobaye en 4 jours. Injecté préventivement, il préserve le cobaye contre 5 doses mortelles environ.

Un tel mélange est donc nettement antitoxique pour le cobaye, il l'est un peu moins pour le lapin, animal plus sensible à l'action de la ricine que le cobaye.

En cherchant à réaliser un mélange complètement inactif, on arrive toujours à reconnaître qu'un tel mélange n'existe pas. — Ainsi, 1 c. c. de ricine + 0,70 c. c. de sérum tue le cobaye en 12 jours, et le même mélange additionné d'une dose mortelle en 4 jours ne tue qu'en 8 jours.

1 c. c. de ricine + 0,75 c. c. de sérum produit chez le cobaye un gros œdème suivi d'une induration persistante, sans le tuer, et ce même mélange additionné d'une dose mortelle est seulement un peu plus pathogène, mais ne tue pas non plus; enfin, le mélange de 1 c. c. de ricine + 0,80 c. c. de sérum n'est plus pathogène du tout, mais il est plus antitoxique que les deux mélanges précédents.

Les deux premiers mélanges sont à la fois toxiques et anti-

1. *Beitraege zur Chem. Physiol. u. Pathol.* Band I, Heft 1/2.

toxiques; le dernier n'est plus toxique, mais il est encore antitoxique, on ne peut donc pas l'appeler *neutre*, mais simplement *minimum actif*.

Pour obtenir un mélange minimum actif pour le lapin, plus sensible que le cobaye, il faut ajouter à 1 c. c. de ricine 0,84 c. c. de sérum. Le mélange *minimum actif* de ricine et d'antiricine est donc différent pour chaque espèce d'animaux de sensibilité différente et même pour les différents individus de la même espèce, ainsi que cela avait été constaté par M. Roux et M. Vaillard pour les mélanges de toxine et d'antitoxine diphtérique et tétanique.

Ceci dit pour caractériser les propriétés des mélanges que jusqu'à présent on a appelés bien à tort *neutres* ou *inactifs*, nous pouvons examiner maintenant la nature des composés que les toxines forment avec les antitoxines.

III

Un mélange minimum actif une fois établi pour un animal quelconque ne redevient jamais spontanément pathogène. Le chauffage de plusieurs jours à 37°, ou à 43° en solutions concentrées, ou diluées dans l'eau distillée, ou dans l'eau physiologique (à 7 0/00), ne le modifie pas sensiblement.

On peut le rendre légèrement pathogène en le traitant par l'eau salée à 10 0/0.

Exp. 1. — Après avoir établi qu'un volume de notre sérum antiricinique (sérum de chèvre) donne un mélange minimum actif pour lapins avec 2 volumes de notre solution de ricine, dont 0,001 c. c. tue le lapin en 3 à 4 jours, on mélange ensemble 1 c. c. de sérum et 2 c. c. de ricine, et on laisse le mélange en repos pendant 24 heures.

Il s'est formé un précipité très abondant. On émulsionne ce précipité, et on en prélève une moitié que l'on injecte au lapin 1770. Le lapin maigrit d'abord un peu, sans présenter aucune réaction appréciable au point de l'inoculation, et revient bientôt à son poids normal.

L'autre moitié est centrifugée. On décante le liquide que l'on remplace par 3,5 c. c. d'eau salée à 10 0/0, et on laisse macérer pendant 6 jours à la température du laboratoire. Alors on centrifuge de nouveau et on injecte séparément le liquide et le dépôt.

Le dépôt tue le lapin 1750 en 4 jours.

Le liquide tue le lapin 2000 en 8 jours.

Les deux animaux présentent à l'autopsie les lésions caractéristiques de l'intoxication par la ricine.

Le mélange, qui contenait 1,000 doses mortelles de ricine pour lapins, agit donc après une macération de 6 jours dans l'eau salée à 10 0/0 à peu près comme 1 dose de ricine libre.

Il ne peut certainement être question d'une destruction de l'antitoxine par l'eau salée ou par la ricine en présence de l'eau salée, mais très probablement d'une redissolution par l'eau salée d'un peu de globuline qui avait été entraînée par le précipité et qui, à son tour, a pu fixer et entraîner un peu de ricine.

La ricine fixée par l'antiricine ne devient donc jamais spontanément libre. Pour la mettre en liberté, il faut détruire l'antiricine par une substance qui n'attaque pas la ricine.

Le fait que la ricine tue certains animaux par ingestion nous a donné l'idée de soumettre à l'action du suc gastrique la ricine, l'antiricine et un mélange minimum actif de ricine et d'antiricine.

Le mélange de 0,5 c. c. de sérum donne avec 1 c. c. d'une solution de ricine dont 0,005 c. c. tue le cobaye en 4 jours, un composé minimum actif pour cobaye.

On traite séparément, par 1 c. c. de suc gastrique frais : 1 c. c. de ricine ; 0,5 c. c. de sérum antiricinique préalablement chauffé pendant 1 heure à 55°, et 1,5 c. c. d'un mélange de 1 c. c. de ricine avec 0,5 de sérum dans de l'eau physiologique acidifiée à 1/10 d'acide chlorhydrique normal. Le volume de tous les liquides est porté à 10 c. c.

On laisse digérer pendant 16 heures à 45°, on neutralise exactement par la soude, et on essaie les liquides *in vitro* sur les hématies de cobaye et *in vivo* sur les cobayes.

EXP. 2 A. — Action des liquides traités par le suc gastrique sur les hématies de cobaye.

AGGLUTINATION APRÈS 24 HEURES, ÉVALUÉE COMPARATIVEMENT					
DOSES de ricine.	RICINE normale.	RICINE traitée par le suc gastrique.	SÉRUM traité par le suc gastr. + ricine normale.	MÉLANGE traité par le suc gastr.	MÉLANGE normal.
0.01 c. c...	aggl. évaluée à	5 0/0	0	4 0/0	0
0.02 —	—	20 0/0	0	5 0/0	0
0.03 —	—	80 0/0	0	10 0/0	0
0.04 —	—	95 0/0	0	20 0/0	0
0.05 —	—	100 0/0	0	50 0/0	0
0.07 —	—	—	0	—	0
0.10 —	—	—	2 0/0	100 0/0	0
1 c. c...	—	—	95 0/0	—	50 0/0

inactif
à toutes
les doses.

EXP. 2 B. — Action des liquides traités par le suc gastrique sur le cobaye.

DOSES de ricine.	RICINE normale.	RICINE traitée par le suc gastrique.	SÉRUM (0.05 c. c.) traité par le suc gastrique + ricine normale.	MÉLANGE traité par le suc gastrique.	MÉLANGE normal.
0.005 c. c.	Cob. 390 + 4 j.	—	—	—	—
0.01 —	Cob. 410 + 2 j.	Cob. 370 0	Cob. 400 + 4 j.	Cob. 280 0	—
0.02 —	—	— 440 0	— 330	— 290	—
0.03 —	—	— 390 —	— — } + 36 h.	— 200	—
0.05 —	—	— 400 —	— 400	— 400	—
0.10 —	—	— 410 + 10 j.	— 410 + 16 h.	— 350 + 5 j.	—
0.5 —	—	— 420 + 3 j.	— —	— 400 + 24 h.	pas de réaction.

Ces deux expériences montrent nettement que le suc gastrique diminue beaucoup l'activité pathogène de la ricine et qu'il détruit complètement l'antiricine. On constate aussi que les résultats de l'expérience *in vitro* et *in vivo* ne concordent pas exactement : ainsi la puissance agglutinante de la ricine traitée par le suc gastrique est plus grande que celle du mélange de ricine et d'antiricine traité de la même façon, tandis qu'au contraire, *in vivo*, le mélange est relativement plus actif que la ricine seule.

Il y a donc probablement une fixation secondaire de la ricine par les produits de la digestion du sérum, produits qui restent insolubles dans l'eau physiologique et retiennent la ricine en présence des globules rouges, mais qui, injectés à un animal vivant, doivent être solubilisés dans l'organisme et laissent alors échapper la ricine qu'ils retenaient.

L'acide chlorhydrique seul, employé à la dose de 1/10 n.

par c. c. de liquide, détruit à peu près exactement autant de ricine que d'antiricine.

Ainsi, la ricine, le sérum antiricinique et un mélange minima actif soumis à l'action de l'acide chlorhydrique 1/10 n. pendant 16 heures à 45° ont donné à l'essai les résultats suivants :

EXPÉRIENCE 3.

DOSES de ricine.	RICINE traitée par l'acide chlorh.	SÉRUM traité par l'acide chlorhydr. + ricine normale.	MÉLANGE traité par l'acide chlorhydr.
0.01 c. c.	Cobaye 370 0	Cobaye 400 0	} inactif à toutes les doses.
0.02 —	— 350 =	— 420 ...	
0.05 —	— 380 + en 10 j.	— 400 ≡	
0.10 —	—	— 410 + en 3 j.	

En présence de ces faits, il était encore intéressant de voir si un mélange non pathogène par injection sous la peau pouvait tuer l'animal par ingestion.

Nous avons donc introduit, à l'aide d'une sonde molle pour ne pas perforer l'estomac, d'une part :

Chez 4 cobayes, 2 c. c. de ricine pure par animal. De ces 4 cobayes, 2 ont survécu sans aucune réaction, les 2 autres sont morts après 10 et 15 jours.

D'autre part, chez 4 cobayes, 2 c. c. par tête d'un mélange minimum actif ; les 4 cobayes ont succombé en 8 à 15 jours.

On peut encore rendre fortement pathogène un mélange inoffensif de ricine et d'antiricine, en le soumettant à l'action prolongée du suc pancréatique, à 45°.

L'action de suc pancréatique sur l'antiricine n'est ni aussi prononcée ni de la même nature que celle du suc gastrique acide.

In vitro, un mélange minimum actif ne devient jamais actif après macération dans le suc pancréatique, tandis que le même mélange traité par le suc gastrique agglutine énergiquement les hématies ; *in vivo*, l'action de la ricine qui pourrait redevenir libre est difficilement dosable parce que le suc pancréatique lui-même n'est pas inoffensif pour les petits animaux.

Exp. 4. — Lapin 1760 reçoit un c. c. d'un mélange minimum actif contenant 100 doses mortelles pour lapin, après traitement par le suc pancréatique.

Il meurt en 2 jours. Petit œdème au point d'inoculation, congestion intestinale assez caractéristique de l'intoxication par la ricine.

Lapin 1850, reçoit la même dose d'une solution de suc pancréatique. Mort en 10 jours.

Cette première série d'expériences, qui avaient pour but de préciser nos connaissances sur l'action réciproque des toxines et des antitoxines, nous ont donc permis de constater qu'un mélange de ricine et d'antiricine, non pathogène et ne contenant pas d'antiricine libre, ne devient jamais spontanément ni plus toxique ni plus antitoxique, et que ces deux substances accolées l'une à l'autre gardent leurs propriétés spécifiques. On peut toujours, dans un tel mélange, retrouver la ricine en détruisant l'antiricine par une diastase protéolytique, et prouver l'existence de l'antiricine par les propriétés immunisantes du mélange que nous examinerons dans le chapitre suivant.

Ces expériences confirment donc l'idée généralement admise aujourd'hui que, *in vitro*, les toxines et les antitoxines ne possèdent aucune action diastasique les unes pour les autres.

IV

Pour une solution de ricine dont 0,003 c. c. tue le cobaye en 3 à 4 jours et un sérum antiricinique (sérum de chèvre) dont 0,1 c. c. donnait avec 0,15 c. c. de notre solution de ricine un mélange minimum actif pour cobayes, nous avons trouvé les constantes d'Ehrlich comme suit :

Exp. 5. — Dose mortelle de ricine = 0,003 c. c.

Mélange minimum actif : 0,1 c. c. de sérum + 0,15 c. c. de ricine = 30 doses mortelles.

Mélange mortel en 4 jours : 0,1 c. c. de sérum + 0,40 c. c. de ricine = 80 doses mortelles.

Différence 0,25 c. c. de ricine = 50 doses mortelles.

Le phénomène d'Ehrlich est donc dans ce cas très prononcé, mais pour obtenir la différence de 50 doses mortelles entre le mélange inactif et le mélange mortel, il est absolument nécessaire d'ajouter au sérum les doses croissantes de ricine en entier, en une seule fois. Il suffit de changer la façon de préparer les mélanges, de préparer d'abord une série de mélanges inactifs, d'ajouter 24 heures après les excès de ricine, et d'injecter ces

mélanges après encore 24 heures de repos, pour abaisser cette différence de 50 à 10 doses mortelles.

Avec la même solution de ricine, et un sérum un peu plus faible nous avons obtenu dans les deux cas les constantes suivantes :

EXPÉRIENCE 6.

Série A. Les doses de ricine sont ajoutées en une seule fois.				1 jour.	2 jours.	3 jours.	4 jours.	Série B. Les excès de ricine sont ajoutés au mélange inact. ap. 24 h. Les mélanges sont injectés aussi après 24 h.				1 jour.	2 jours.	3 jours.	4 jours.
0.2 c. c. sérum	+	0.14 c. c. ricine	Cob. 220	pas de réaction.											
—	+	0.15 —	—	230	—	—	—	+	0.02 c. c. ricine.	Cob. 220	—	—	—	—	—
—	+	0.18 —	—	250	—	—	—	—	0.04 —	—	220	—	—	—	—
—	+	0.20 —	—	250	—	—	—	—	0.06 —	—	230	—	—	—	—
—	+	0.22 —	—	270	—	—	—	—	0.08 —	—	270	—	—	—	—
—	+	0.24 —	—	300	—	—	—	—	0.10 —	—	330	—	—	—	—
Différence : 20 doses mort.												Différence : 4 doses mort.			

L'expérience *in vitro* sur les hématies de lapin ou de cobaye donne des résultats encore plus nets et plus faciles à apprécier.

En faisant agir notre solution de ricine sur 0,5 c. c. d'hématies de lapins lavées, en suspension dans 5 c. c. d'eau physiologique, on constate que la première réaction appréciable (une agglutination de 3 0/0 environ de toutes les hématies) est obtenue par la dose de 0,01 c. c. de ricine, et l'agglutination complète de toutes les hématies en une seule masse par la dose de 0,6 c. c. de ricine.

Nous avons un sérum antiricinique dont 0,2 c. c. neutralisent l'action de 0,1 c. c. de ricine.

En faisant agir, dans les conditions indiquées, sur les hématies de lapin les mélanges qui suivent, on obtient l'agglutination complète par le mélange n° 6.

EXPÉRIENCE 7 A.

1.	0.2 ar.	+	0.1	r.	on obtient :		pas de réaction.
2.	—	+	0.12	—	}		agglutination croissante, de 2 0/0 à 10 0/0.
3.	—	+	0.18	—			
4.	—	+	0.20	—			
5.	—	+	0.22	—			
6.	—	+	0.24	—			agglutination de 99 0/0.
7.	—	+	0.26	—	}		agglutination croissante, de 90 0/0 à 100 0/0.
8.	—	+	0.28	—			
9.	—	+	0.30	—			
10.	—	+	0.35	—			
11.	—	+	0.40	—			

Tandis qu'en ajoutant les excès de ricine aux mélanges

minimum actifs préparés 24 heures d'avance, on obtient le même résultat dans le mélange n° 3.

EXPÉRIENCE 7 B.

1.	(0.2 ar. + 0.4 r.)	+ 0.02 r.	on obtient :	pas de réaction.
2.	(0.2 ar. + 0.1 r.)	+ 0.08 —	agglutination :	2 0/0
3.	—	+ 0.10 —		99 0/0
4.	—	+ 0.12 —		
5.	—	+ 0.14 —		
6.	—	+ 0.16 —		
7.	—	+ 0.18 —		
8.	—	+ 0.20 —		
9.	—	+ 0.25 —		
10.	—	+ 0.30 —		
11.	—	—		

99 à 100 0/0.

Il est à noter pourtant que ce résultat n'est obtenu qu'à la fin de l'expérience (après 24 heures). Dans les premières 2 à 3 heures, l'agglutination augmente (intensité et rapidité) régulièrement et proportionnellement à l'augmentation des doses de ricine ajoutées, — de sorte qu'au début de l'expérience les réactions des mélanges 1 à 5 de la série B sont plus avancées que celles de la série A., tandis qu'au contraire les réactions des mélanges 6 à 11 de la série B sont moins avancées que celles de la série A.

Dans les mélanges de la série B, l'excès de ricine ajoutée aux composés neutres est donc fixée par ces composés, mais cette fixation est moins intime et certainement d'une autre nature que celle de la série A.

Les graphiques du tableau n° 1 représentent les allures différentes de ces deux séries de réactions.

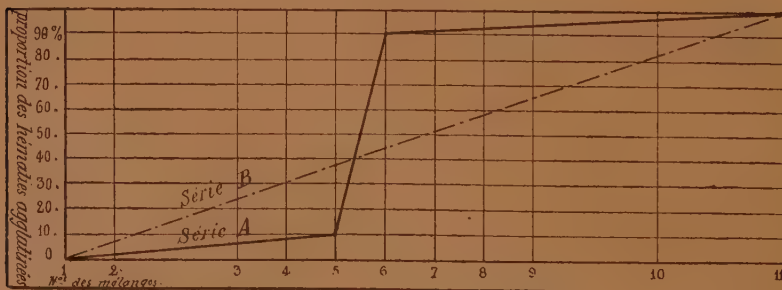


Fig. 1.

On obtient des résultats analogues avec la toxine et l'anti-toxine diphtérique.

Toxine diphtérique. Dose mortelle en 3 ou 4 jours : 0,01 c. c.

EXPÉRIENCE 8.

Série A. Mélanges préparés en une seule fois.				JOURS						Série B. Mélanges préparés en deux fois, les excès de toxine ajoutées après 6 h.				JOURS					
				1	2	3	4	5	6					1	2	3	4	5	6
1 U. J.	+ 0.40 c. c. tox.	Cob. 260		0	0	0	0	0	0	+ 0.03 c. c. de tox.	Cob. 250			—	—	—	—	—	—
—	+ 0.43 —	Cob. 250		—	—	—	—	—	—	+ 0.05 —	Cob. 270			—	—	—	—	—	—
—	+ 0.45 —	Cob. 330		—	—	—	—	—	—	+ 0.07 —	Cob. 290			—	—	—	—	—	—
—	+ 0.50 —	Cob. 350		—	—	—	—	—	—	+ 0.10 —	Cob. 280			—	—	—	—	—	—
—	+ 0.55 —	Cob. 310		—	—	—	—	—	—	+ 0.12 —	Cob. 295			—	—	—	—	—	—
—	+ 0.60 —	Cob. 320		—	—	—	—	—	—	+ 0.15 —	Cob. 320			—	—	—	—	—	—

Différence : 0,10 c. c. de toxine.

Différence : 0,05 c. c. de toxine.

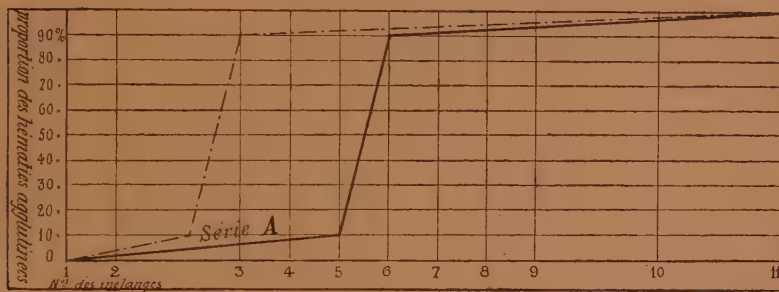


Fig. 2.

Suivant la façon dont on prépare les mélanges, on obtient donc pour la ricine un mélange mortel en ajoutant à une quantité constante d'antiricine tantôt 48, tantôt 32 doses mortelles, pour la toxine diphtérique, tantôt 50, tantôt 43 doses mortelles.

On constate en outre qu'un mélange non pathogène et ne contenant pas d'antitoxine libre est malgré cela antitoxique : pour la ricine, sur 28 doses mortelles, il fixe encore 4 doses mortelles ; pour la diphtérie, il fixe 3 doses mortelles sur 40.

Un tel mélange injecté préventivement est aussi nettement antitoxique.

EXPÉRIENCE 9.

Diphtérie. Inj. du mél. inactif et 24 h. après 1 dose mort. : léger œdème.
 — — — — — 2 — : + en 5 jours.
 — — — — — 5 — : + en 2 jours.

Pour répondre à l'objection possible que les mélanges inoffensifs que nous avons employés pouvaient contenir un peu d'antitoxine libre, nous avons injecté à une série de cobayes d'abord

des mélanges nettement pathogènes et, 24 heures, après de la toxine libre, et nous avons constaté :

EXPÉRIENCE 10.

Ricine. Mélange pathogène..... : fort œdème, nécrose survie.
 — — — — — et 24 h. après 1 dose mort. : + en 10 jours.
 — — — — — 2 doses mort. : + en 5 jours.
Tétanos. 1 dose mortelle tue en 3 à 4 jours.

EXPÉRIENCE 11.

Mélange légèrement pathogène et 24 h. après 1 dose mort. : + en 7 jours.
 — fortement pathogène — 1 — : + en 7 —
 — mortel en 6 jours — 1 — : + en 5 —

Les résultats des expériences 5 et 6 nous ont donné à penser qu'en ajoutant la ricine à l'antiricine en doses encore plus fractionnées, on obtiendrait un mélange pathogène avec des quantités de ces deux substances qui, mélangées ensemble en une seule fois, donnent toujours un composé inoffensif.

Exp. 12. — Et en effet, le mélange de 0,4 c. c. de sérum et de 0,6 c. c. de ricine préparé en une seule fois et injecté au cobaye 260 ne donne aucune réaction appréciable, l'animal se porte bien et augmente de poids, tandis que le mélange de 0,4 c. c. de sérum + 4 fois 0,15 c. c. de ricine ajoutées au sérum en 4 doses avec des intervalles de 10 à 24 heures et un repos de 24 heures après l'addition de la dernière dose, injecté au cobaye 250, le fait maigrir beaucoup et le tue en 20 jours.

Le mélange de 0,4 c. c. de sérum + 3 fois 0,15 c. c. + 0,10 c. c. de ricine, n'est pas encore inoffensif.

Le mélange complètement inoffensif serait à peu près de 0,4 c. c. de sérum + 3 fois 0,15 c. c. + 0,05 c. c. donc, en tout, 0,5 c. c. de ricine.

Le mélange inoffensif est donc tantôt de : 0,4 c. c., de sérum, + 0,6 c. c. de ricine = 120 doses mortelles ; tantôt de 0,4 c. c. de sérum + 0,50 c. c. de ricine = 100 doses mortelles.

On obtient des résultats analogues en ajoutant à la ricine de l'antiricine en doses fractionnées ; ainsi, si 10 d'antiricine ajoutées à 15 de ricine en une seule fois donnent un mélange minimum actif pour cobaye, on obtiendra un composé jouissant à peu près des mêmes propriétés pour le cobaye avec 8 d'antiricine + 15 de ricine, à la seule condition d'ajouter l'antiricine par 2/10, en 4 doses successives ; on peut donc en conclure que les

deux substances peuvent se fixer réciproquement de la même façon et en proportions variables.

De l'ensemble de nos expériences nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° La formation des précipités dans les mélanges en proportions différentes de ricine et d'antiricine, ainsi que les propriétés variables des mélanges contenant des quantités identiques de toxine et d'antitoxine, et enfin les propriétés à la fois antitoxiques et toxo-actifs des composés des toxines et des antitoxines mélangées en proportions quelconques, prouvent d'une façon incontestable que ces deux substances se fixent ou s'imprègnent réciproquement en proportions variables. Mélangées ensemble, les toxines et les antitoxines ne forment donc pas un composé unique, mais une série de composés dans lesquels l'une des deux substances est plus ou moins imprégnée par l'autre, et qui sont par conséquent plus ou moins actifs ;

2° Les antitoxines se fixent *in vitro* sur les toxines et enaturent plus ou moins les affinités sans les détruire, leur action sur les toxines est donc exactement de la même nature que celle des immunisines sur les microbes.

RECHERCHES SUR LES MODES D'UTILISATION DU CARBONE TERNAIRE PAR LES VÉGÉTAUX ET LES MICROBES

PAR P. MAZÉ

DEUXIÈME MÉMOIRE

Les conclusions exposées dans le développement du premier mémoire (ces *Annales*, mars 1902) ne présentent pas la netteté à laquelle il faut viser dans les questions de l'ordre de celles qui font l'objet de ce travail.

Ce défaut est inhérent, comme je l'ai fait observer plusieurs fois, à la nature même des matériaux sur lesquels ont porté mes investigations. C'est qu'à côté des aliments ternaires, il y a toujours des substances albuminoïdes dont les modifications marchent de pair avec celles que subissent les premiers.

En présence de l'air, il est probable que les matières azotées absorbent de l'oxygène et dégagent de l'acide carbonique, dans le cours de transformations qui préparent leur incorporation à la substance vivante; mais on ne sait rien sur la valeur des échanges gazeux qui peuvent être attribués à ce travail, et on ignore complètement quelle est la grandeur de la portion de la molécule albuminoïde alimentaire qui entre définitivement dans la constitution du cytoplasme et du noyau.

Ainsi, il est impossible de démêler, même d'une façon approximative, la part qui revient aux matières ternaires et celle qu'il faut attribuer aux matières azotées dans la production du CO_2 qui se dégage au cours du processus d'assimilation. C'est pour cela que, dans l'estimation de l'acide carbonique éliminé par les cotylédons d'arachide, tableau XIV, 1^{er} mémoire, je n'ai considéré que la moitié seulement comme résultant du dédoublement ou de la combustion du sucre, certain de cette façon de ne pas exagérer les faits en faveur du résultat à atteindre.

Si l'analyse des phénomènes manque déjà de précision dès l'origine des transformations premières qui s'effectuent dans les aliments, à plus forte raison faut-il abandonner tout espoir de suivre les manifestations extérieures des travaux de synthèse et d'analyse qui s'opèrent continuellement dans la substance vivante déjà formée.

Puisque le carbone quaternaire est si encombrant, il suffit de se placer dans des conditions qui permettent de l'éliminer; les mucédinées vont nous en fournir les moyens. Mais avant d'aborder cette question, je dois dire qu'il était cependant utile de suivre chez les végétaux supérieurs les transformations des aliments ternaires aussi loin que le permettent les notions acquises dans l'état actuel de la science; et il était surtout intéressant d'établir les relations de la vie végétative et de la vie fermentative, de montrer qu'en somme celle-ci n'est qu'un tronçon de celle-là.

On devine aisément l'importance de cette notion. Puisqu'un végétal comme le pois est capable de transformer les sucres fermentescibles, dans la vie anaérobie, exactement comme la levure, et que leur dédoublement en alcool et acide carbonique est une transformation normale accomplie en vue de l'incorporation à la substance vivante de la fraction utilisable de la molécule de sucre, on est tout de suite conduit à se demander si les phénomènes de fermentation en général ne doivent pas présenter ce caractère physiologique, au lieu d'être une manifestation anormale de la vie gênée, comme le veut l'opinion courante.

Les faits établis pour le pois se résument dans les deux propositions suivantes :

Les semences de pois, privées d'oxygène, dédoublent les sucres fermentescibles en alcool et acide carbonique, mais ils ne construisent pas de substances vivantes.

Placées dans les conditions favorables, elles exercent la même action sur les sucres, et utilisent l'alcool à la construction de la plantule.

Ces conclusions ne s'appliquent pas intégralement à la levure; mais c'est parce qu'on n'a pas pu les établir par l'expérience, et non parce qu'elles ne correspondent pas à la réalité des faits.

Par contre, elles s'appliquent à la lettre à un *ascomycète*

*l'Eurotiopsis Gayoni*¹ qui possède, parmi un grand nombre de propriétés physiologiques très curieuses, celle de faire fermenter les sucres avec la même activité que la levure, et de se développer en milieu minéral aux dépens de l'alcool, mieux, disons-le tout de suite, que si on lui offrait du dextrose.

C'est donc ce champignon qui va nous permettre de pousser, beaucoup plus loin que les végétaux supérieurs, l'étude que je poursuis, et en même temps de dégager les conclusions qui ont déjà été formulées, de ce qu'elles présentent de flottant.

A la rigueur, j'aurais pu m'adresser à d'autres champignons ; on connaît plusieurs espèces de mucors qui dédoublent activement les sucres fermentescibles en alcool et acide carbonique, et qui sont quelquefois capables de consommer l'alcool ; l'*Aspergillus niger* se nourrit également très bien d'alcool, et si les spores ne peuvent pas se développer dans le milieu Raulin, où l'alcool remplace le saccharose, il est probable qu'avec un peu d'accoutumance, elles arriveraient vite à acquérir cette faculté.

Ce qui m'a déterminé à accorder la préférence à *l'Eurotiopsis*, c'est son haut degré de polyphagie ; il est, en outre, capable de prendre son azote aux substances azotées des plus variées, depuis l'ammoniaque et l'acide nitrique jusqu'aux matières albuminoïdes, ce que les mucédinées ne font pas toujours très volontiers. Il y aura donc là aussi un terrain tout préparé pour faire avec les matières azotées des observations analogues à celles que nous allons faire avec les substances ternaires.

II

Pour reprendre les faits au point où on les a laissés dans le mémoire précédent, il faut commencer par étudier comparative-ment la nutrition hydrocarbonée et l'alimentation en alcool de *l'Eurotiopsis Gayoni*.

Ce champignon pousse très bien sur milieu Raulin ; j'ai utilisé ce milieu sans apporter de modification à sa composition minérale, en mettant à profit les notions établies par M. Laborde (*loc. cit.*) dans un travail très complet sur la physiologie de *l'Eurotiopsis*.

1. LABORDE, ces *Annales*, 1897, p. 4.

Pour obtenir des résultats aussi comparables que possible, lorsqu'on fait varier la nature de l'aliment ternaire, il y a quelques précautions à prendre :

Ainsi, la profondeur du liquide influe d'une manière inégale sur le développement du champignon, lorsqu'on lui offre des aliments différents. En milieu sucré, il émerge assez vite du liquide ; en milieu alcoolisé, il met un temps bien plus long, à égalité d'épaisseur, pour parvenir à la surface ; cela tient non pas à une infériorité de l'aliment alcoolique, mais à une production plus abondante d'acide carbonique aux dépens du sucre, qui, en se transformant en alcool, donne naissance à une certaine quantité de gaz qui ne se forme pas lorsqu'on fournit directement de l'alcool. Le mycélium gonflé de bulles imperceptibles d'acide carbonique flotte dans le liquide et arrive facilement à la surface, condition nécessaire pour obtenir un développement rapide.

Lorsqu'on remplace le sucre par l'alcool, le mycélium reste au fond du liquide ; il parvient à la surface par voie de croissance en formant une végétation arborescente semblable à celle, bien connue des bactériologistes, que produisent toutes les moisissures qui poussent accidentellement dans les bouillons de culture ; mais, dans ces conditions, le mycélium met un temps considérable à atteindre la surface, si l'épaisseur de la couche liquide atteint 4 à 5 c. c. ; il construit peu de substance vivante tout en consommant beaucoup d'aliments pour son entretien. Il y a donc là un inconvénient qu'il faut éviter ; on y arrive en faisant des cultures sur des milieux de quelques millimètres de profondeur seulement.

Quand le mycélium a atteint la surface, il se développe avec une rapidité comparable à celle de l'*aspergillus niger*, de sorte qu'au bout de 2 ou 3 jours, le voile atteint une épaisseur telle que les conditions d'existence des portions inférieures deviennent difficiles ; elles manquent d'oxygène ; il faut donc mettre fin aux expériences avant que le végétal ne se soit créé à lui-même des conditions de milieu trop différentes de celles qu'il avait au début.

Cet inconvénient n'existe pas pour l'alcool, car la nécessité de réduire l'épaisseur de la couche liquide fait que la quantité d'aliment ternaire que l'on peut introduire dans une culture est insuffisante pour permettre la formation d'un voile trop épais.

Cette obligation entraîne la nécessité de choisir des récipients à fond parfaitement plan; s'il est inégal, le mycélium émerge plus vite dans les régions les moins profondes; la culture y sera relativement plus âgée; elle aura consommé plus longtemps sans produire une augmentation correspondante de poids de végétal, car l'épaisseur du voile n'est pas proportionnelle au temps; on pourra donc obtenir des cultures, dans des récipients à fond irrégulier, d'un poids inférieur à celles qui se seront développées en voile régulier, et qui cependant auront quelquefois consommé une quantité d'aliments moins élevée que les premières.

On trouvera quelques contradictions de cette nature dans le cours de ce travail; c'est à cette cause qu'il faudra les rapporter; je n'ai pas pu les éviter parce qu'il est difficile de se procurer des fioles coniques tubulées semblables à celles qui m'ont déjà servi pour l'étude des végétaux supérieurs (1^{er} mémoire, p. 211) dont le fond soit parfaitement plan.

Les spores, suivant leur âge, mettent un temps plus ou moins long à germer; il y a donc, au début des cultures, un temps mort qui précède le développement et qui présente une durée variable; ce détail n'offre aucun inconvénient si l'on ne considère que le poids de substance vivante et la quantité d'aliment qu'elle a détruit; mais il n'en va pas de même si l'on introduit dans l'interprétation des résultats la notion de temps. Pour tourner la difficulté, on prenait les spores sur des cultures en voie de développement; on les faisait germer préalablement et on vérifiait l'état de la germination par un examen microscopique, avant de s'en servir comme semence; de cette façon, la culture partait sûrement sans subir de temps d'arrêt; sa durée était donc nettement déterminée.

Je dois dire enfin que la culture originelle que j'ai utilisée sortait de la collection de l'Institut Pasteur, où elle avait été conservée sur des milieux différents du liquide Raulin; elle poussait bien sur milieu sucré, mais très mal sur un milieu alcoolisé. Pour obtenir sur ce dernier un développement rapide, j'ai été obligé de l'accoutumer pendant plusieurs mois à l'alcool; les progrès de l'accoutumance se font encore sentir dans les résultats de mes expériences, et l'évolution a été telle qu'en ce moment l'augmentation de poids dans l'unité de temps, une

fois le voile bien formé, est plus élevée, dans le cas d'alimentation en alcool que dans la nutrition hydrocarbonée.

Ces observations faites une fois pour toutes, on peut passer en revue les résultats des expériences.

Le volume de liquide Raulin ordinaire, renfermant 5 0/0 de saccharose, employé pour chaque culture, était de 50 c. c.; la stérilisation de la liqueur à la température de 100° pendant un quart d'heure, provoquait l'inversion à peu près complète du saccharose, grâce à la présence de l'acide tartrique libre. La semence apportait 1 c. c. de liquide, si bien que la quantité de sucre fourni par culture était légèrement supérieure à 2,5 gr. Le récipient dont je me suis servi a été déjà décrit dans le premier mémoire, ainsi que les appareils d'absorption. L'acide carbonique a été recueilli suivant le procédé également indiqué. Toutes les expériences ont été réalisées à la température de 29-30°. Chaque expérience permettait d'évaluer :

1° Le poids de végétal obtenu ;

2° Le poids d'aliment consommé ;

3° Le poids d'acide carbonique dégagé ;

4° Le rendement exprimé par le rapport du poids du végétal au sucre consommé, calculé sur 100 de sucre.

Ces notions sont également importantes pour l'interprétation des résultats ; mais celle qui doit attirer plus particulièrement l'attention, c'est l'acide carbonique dégagé ; ses variations vont nous permettre de mettre en relief les relations qui existent entre les divers aliments ternaires qu'on peut offrir à l'eurotiopsis, considérés au point de vue de leur aptitude à produire de la matière vivante.

L'étude du rendement tend vers le même but ; le rendement théorique fourni par le sucre ne peut pas être supérieur à 50 0/0, puisque l'alcool ne représente que la moitié du poids du sucre ; il peut atteindre 56 0/0 environ si l'on fait intervenir l'azote de l'ammoniaque, si toutefois il n'y a pas de perte de matière au cours des synthèses qui aboutissent à la formation des substances albuminoïdes. Pratiquement, le rendement est bien inférieur à 50 0/0 du poids du sucre consommé, en raison des dépenses d'entretien qui viennent s'ajouter à celles qu'entraîne la construction.

Avec l'alcool, au contraire, le rendement théorique atteint 100 0/0 à peu près ; 106 0/0, environ avec la participation de l'azote

ammoniacal, toujours avec la réserve de la perte possible de poids de matière.

Pratiquement, il sera aussi bien inférieur à ce chiffre; mais il doit rester de beaucoup supérieur à celui que fournit le sucre; car il n'y a pas de raison d'admettre *a priori* que les dépenses d'entretien diffèrent d'un mode d'alimentation à l'autre, le sucre et l'alcool n'ayant aucune action sur la réaction du milieu.

Voici maintenant les résultats fournis par quelques cultures faites sur milieu sucré :

TABLEAU I

Nos d'ordre.	Durée de l'expérience jours.	Sucre mgr.	Poids du végétal mgr.	Rendement.	CO ² dégagé mgr.	CO ² dégagé p r unité de poids et de temps.
1.	5 j. 19 h.	1957	677	34,6	1630,8	0,41
2.	5 — 17 —	1863,4 ⁽¹⁾	532	30,7	1358,4	0,43
3.	4 — 18 —	1344,3	437,7	32,63	938,6	0,45
4.	4 — 18 —	1319,2	431,9	32,73	936,8	0,45

Les chiffres de la dernière colonne sont très voisins les uns des autres; on remarque, en outre, que plus la culture est âgée, plus la quantité d'acide carbonique baisse, mais si faiblement qu'il est inutile d'insister sur ce fait pour le moment.

Les nombres qui expriment les valeurs des rendements sont en contradiction avec les résultats que l'on pouvait prévoir; plus la culture est âgée, plus le rendement doit baisser; c'est une loi qui ne demande pas d'explication; elle se conçoit d'elle-même; la contradiction doit être mise sur le compte de l'accoutumance de l'eurotiopsis au milieu Raulin sur lequel il n'avait pas été cultivé depuis longtemps. Les différences de cette nature n'ont fait que s'accroître dans le cours de mes recherches; le rendement, qui est ici de 1/3 environ, va tomber, dans des expériences faites 6 mois plus tard, à 30 0/0 et au-dessous, tandis qu'entre les n° 1 et 2 d'une part, 3 et 4 d'autre part, il y a un intervalle de trois mois durant lequel l'eurotiopsis a subi une dizaine de passages sur milieu Raulin.

Le tableau II résume les résultats fournis par les cultures faites sur milieu Raulin dans lequel on a remplacé le sucre par l'alcool; comme le courant d'air entraîne une quantité sen-

1. Ce chiffre est erroné; il ne peut provenir que d'une faute de calcul que je n'ai pas pu rectifier, car le dosage du sucre par la méthode ordinaire à la liqueur de Fehling se fait très facilement dans le liquide Raulin; mais comme je l'ai fait figurer par mégarde dans la note des C. R., je l'ai conservé ici afin de faire remarquer l'erreur.

sible d'alcool, on prévient les pertes par évaporation en interposant sur son trajet un double barboteur à eau distillée plongeant dans la glace fondante. Les cultures 1 et 2 ont reçu chacune 26 c. c. de liquide alcoolisé à 2, 5 0/0 environ en poids; le n° 3 en a reçu 35 c. c.; j'ai employé cette concentration parce qu'elle correspond à 5 0/0 de sucre; mais l'eurotiopsis se développe très bien en présence de 8 0/0 d'alcool, comme M. Laborde l'a montré.

TABLEAU II

N°s d'ordre.	Durée de l'expérience.	Alcool consommé mgr.	Poids du mycélium mgr.	Rendement.	CO ² dégagé mgr.	CO ² produit par unité de poids et de temps.
1.	9 j. 3 h.	356,3	463,8	46,01	386,9	0,26
2.	10 — 5 —	440	485,4	42,11	495,1	0,26
3.	9 —	581,3	292,1	50,25	586,2	0,22

Les chiffres de la dernière colonne sont encore ici à peu près identiques. Les relations qu'ils présentent avec les chiffres correspondants du tableau I sont celles que l'on pouvait prévoir; il faut remarquer, en effet, que la quantité d'acide carbonique dégagée est à peu près égale au poids d'alcool consommé. Or cet alcool correspond à un poids double de sucre; si donc on avait récolté, dans le même temps, le même poids de mycélium aux dépens du sucre, on aurait obtenu un poids double de CO², c'est-à-dire que les chiffres de la dernière colonne eussent été de même ordre de grandeur que ceux du tableau I.

Mais il n'en va pas de même du rendement; rapporté à un poids double de matière, il tombe bien au-dessous des chiffres obtenus avec le sucre. On peut mettre, du moins en apparence, ce résultat sur le compte du temps; car, je l'ai déjà dit, plus la durée de l'expérience augmente, plus le rendement baisse; mais le rendement et la quantité d'acide carbonique éliminé sont deux faits étroitement liés l'un à l'autre; plus le rendement baisse, plus la quantité de CO² dégagé augmente; donc, si on met l'un des résultats sur le compte du temps, l'autre doit être rapporté à la même cause, si bien que l'identification des deux modes d'alimentation que nous poursuivons en ce moment se traduit dans ces résultats par une différenciation.

Celle-ci s'accroît encore davantage si on veut la traduire par des chiffres. Considérons en effet les expériences réalisées en milieu alcoolisé; on peut admettre provisoirement que le

mycélium obtenu en partant de l'alcool et de l'ammoniaque représente, en alcool consommé, une quantité égale à son poids; la différence entre le poids total d'alcool disparu et le poids de mycélium obtenu exprime donc la quantité d'alcool qui a servi à l'entretien du végétal; or cette portion a subi à peu près complètement la combustion totale. Mettons en regard les poids d'acide carbonique calculés de cette façon et les poids fournis par l'expérience. Faisons de même pour les expériences 3 et 4, du tableau I, en admettant que c'est l'alcool correspondant au sucre consommé qui a servi à la construction et à l'entretien du poids de plante obtenu. Les résultats sont les suivants :

TABLEAU III

SUCRE				ALCOOL			
Expériences.	Poids calculé mgr.	Poids obtenu mgr.	Différences mgr.	Expériences.	Poids calculé mgr.	Poids obtenu mgr.	Différences mgr.
3.	1106,1	938,6	+ 167,5	1	367,6	386,9	— 19,3
4.	1100,5	936,8	+ 163,7	2	487,2	496,1	— 7,9
				3	533,2	586,2	— 53

Les différences, comme on le voit, sont de signe contraire; elles sont très sensibles dans le cas du sucre, faibles au contraire dans le cas de l'alcool. Il y a donc là une distinction bien nette à établir dans le mode d'action de l'eurotiopsis Gayoni sur le sucre et l'alcool; mais nous ne sommes pas encore en mesure d'en donner l'interprétation.

Cette anomalie m'a conduit à vérifier les résultats de mes expériences. J'ai fait, dans ce but, le bilan du carbone dans les cultures 3 et 4 tableau I. On a déterminé le carbone total du liquide de culture avant l'expérience par la combustion de l'extrait; on a fait la même opération sur le résidu après l'expérience; on a dosé également le carbone du mycélium. Voici les résultats de cette vérification faite sur les éléments de l'expérience 3.

Carbone du mycélium.....	225,1
Carbone du CO ² dégagé.....	256
Carbone dans l'extrait.....	616,4
Total.....	1097,5
Carbone fourni.....	1094,4

Ces chiffres montrent qu'au point de vue de l'exactitude, les expériences 3 et 4 ne laissent rien à désirer; mais il y a dans

les résultats quelque chose d'inexplicable; on ne saurait s'en étonner, car on sait peu de choses sur les phénomènes de la vie protoplasmique; retenons simplement, pour le moment, cette contradiction à laquelle on ne s'attendait pas.

Les rapports de l'eurotiopsis avec l'oxygène atmosphérique peuvent servir à caractériser les deux modes d'alimentation que nous venons d'examiner, au même titre que le dégagement d'acide carbonique. Avec les notions que nous possédions, nous avons pu prévoir les divers résultats enregistrés; il est facile d'en déduire aussi, *a priori*, que les cultures d'eurotiopsis absorberont, pour un même poids de plante fabriqué, la même quantité d'oxygène, qu'elles se développent aux dépens du sucre ou qu'elles poussent en présence d'alcool. Le dédoublement du sucre en alcool et acide carbonique est, en effet, une transformation indépendante de l'intervention de l'oxygène atmosphérique. Ce n'est qu'à partir de la formation de l'alcool qu'il y a absorption d'oxygène, et c'est pour cela qu'il n'y aura toujours qu'une même quantité d'assimilée, du moins dans les conditions indiquées. Ces résultats se traduiront dans la valeur du quotient respiratoire; le dénominateur du rapport de l'acide carbonique à l'oxygène restant le même dans les deux cas, celui-ci sera proportionnel au numérateur. Or nous venons de constater que l'alimentation hydrocarbonée donne naissance à une quantité d'acide carbonique deux fois plus grande que l'alimentation en alcool. Cela veut dire que si la valeur du quotient respiratoire est 1 dans le premier cas, elle sera 0,5 à peu près dans le second.

Pour vérifier cette déduction, il faut faire des cultures dans une atmosphère confinée. La connaissance de la composition de l'atmosphère limitée, avant et après l'expérience, permettra de fixer la grandeur et la nature des échanges gazeux entre l'air et la plante, pendant toute la durée de la culture.

Je n'ai pas déterminé directement la composition initiale de l'air mis en contact avec les cultures; elle a été déduite de la richesse de l'atmosphère finale en azote. J'ai donc admis implicitement qu'il n'y a pas eu d'azote absorbé ou éliminé par les cultures.

J'ai fait usage de récipients de grande capacité; les cultures, en présence de l'alcool, ont été réalisées dans des fioles à fond

plat de 1 litre de capacité; mais il fallait prendre la précaution d'ensemencer légèrement, de façon à obtenir quelques filots de mycélium isolés à la surface du liquide; un voile régulier de 15 centimètres de diamètre environ, tel que les fioles permettaient d'en obtenir, aurait absorbé, au bout de quelques heures après son apparition, tout l'oxygène disponible.

C'est ce qui se produit avec le sucre; le mycélium, si légèrement que l'on sème, a une tendance à se développer à la surface du liquide de façon à former un réseau complet, avant de donner naissance à des filaments aériens. Dans ces conditions, l'oxygène est absorbé si vite, qu'on n'en trouve plus de traces dès que le voile devient nettement apparent.

Pour cette raison, les cultures en milieu sucré ont été faites dans des ballons de 2 litres, à fond rond; on y introduisait seulement 50 c. c. de liquide de façon à obtenir peu de surface; on pouvait ainsi laisser la culture se développer jusqu'au 4^e jour.

Mais le procédé n'est pas non plus exempt de tout reproche; l'inconvénient réside dans l'inégale épaisseur du liquide; le voile se forme d'abord à la périphérie; de plus, le mycélium, qui reste plus longtemps immergé vers le centre, produit de petites quantités d'alcool libre, dont on ne peut pas tenir compte; il y a donc un léger excès d'acide carbonique dû à une transformation dont le champignon n'a probablement pas tiré parti.

Les fioles et les ballons doivent remplir la double condition de résister au vide et de supporter la stérilisation à 120°. Ils sont fermés d'un bouchon à deux tubulures, au-dessous duquel on place un fort tampon de coton retenu par un étranglement du col.

Sur l'une des tubulures on place un tube manométrique dont la branche descendante a 1 mètre de longueur; son extrémité ouverte plonge dans un petit réservoir de mercure; celui-ci est formé par un petit tube cylindrique de 5 centimètres de hauteur, dans lequel on introduit 4 ou 5 c. c. de mercure; il porte une ouverture latérale qui permet la communication avec l'atmosphère; un bouchon à un trou laisse passage au tube manométrique qui vient plonger jusqu'au fond du tube; on a ainsi une colonne de mercure qui permet de suivre très exactement les variations de pression dues à l'absorption ou au dégagement de gaz dans l'atmosphère de l'appareil.

La deuxième tubulure porte un tube vertical, muni d'un joint en caoutchouc fermé par un obturateur ; c'est ce joint qui permettra d'adapter l'appareil à une pompe à mercure, de façon à en extraire complètement le gaz à la fin de l'expérience. Tous les joints et les bouchons sont noyés sous le mercure au moyen de manchons convenablement disposés.

Pour la mise en train des cultures, il y a quelques précautions à prendre ; les cultures sur milieu sucré dégagent plus d'acide carbonique qu'elles n'absorbent d'oxygène ; il y a donc augmentation de pression dans l'appareil ; pour prévenir les pertes de gaz provoquées par excès de pression, il faut y faire, au moyen d'une trompe, un vide de 10 à 12 c. c. de mercure.

La précaution est superflue lorsqu'on cultive le champignon sur un liquide alcoolisé ; il y a, en effet, dans ces conditions, plus d'oxygène assimilé que d'acide carbonique éliminé ; la pression baisse à l'intérieur de la fiole et le mercure monte dans le tube manométrique.

Pour recueillir les gaz des récipients de culture à la fin de l'expérience, on adapte, comme je l'ai dit, les fioles à une pompe à mercure, et on dirige les gaz dans un volumètre de 2 litres environ de capacité, exactement 19,495,5 c. c. à 15°. Quand on a obtenu une dépression convenable au-dessus des cultures, on les porte à une température de 65°, de façon à tuer le mycélium, on laisse refroidir vers 30° et on continue le vide jusqu'à provoquer une ébullition tumultueuse des liquides de culture ; on est certain de cette façon de recueillir complètement l'air des appareils. Le volume de l'atmosphère gazeuse après l'expérience étant déterminé, on en fixe la composition par l'analyse eudiométrique, et de sa richesse en azote on déduit le volume de l'atmosphère initiale fournie aux cultures ; on a ainsi tous les éléments cherchés ; on recueille également le mycélium et on en établit le poids ; mais il est impossible de recueillir intégralement l'alcool non consommé.

Les appareils d'analyse qui m'ont servi ne présentent pas de robinet ; ce sont : la pompe, le volumètre et l'eudiomètre de M. Schlöesing fils.

Le tableau suivant résume les résultats fournis par deux expériences réalisées dans ces conditions. Les volumes gazeux sont ramenés à 760 et à 0°.

TABLEAU V

		Sucre interverti.	Alcool.
Poids du mycélium.....	mgr.	211	96,2
Durée de l'expérience.....	jours.	4	6,44
Matière consommée.....	mgr.	630	—
CO ² dégagé.....	c. c.	251,73	93,93
— poids.....	mgr.	495	184,7
— par unité de temps et de	poids.	0,58	0,29
O consommé.....	c. c.	213,66	184,85
— poids.....	mgr.	305	164,36
— par unité de temps et de	poids.	0,36	0,60
Rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}}$ en volume.....		1,17	0,508

Voici maintenant, les chiffres qui ont servi à calculer les éléments du tableau V.

TABLEAU VI

		Milieu sucré.	Milieu alcoolisé.
Volume d'air initial.....	c. c.	1711,31	914,9
— d'air final.....	—	1749,4	814
Composition	} Azote..... centésimale de } Oxygène..... l'atmosphère. } Acide carbon.	77,28	87,72
		8,33	0,88
		14,39	11,4
Composition	} Azote..... absolue. } Oxygène..... absolue. } Acide carb...	1351,93	722,81
		145,72	7,25
		251,73	93,93

Le tableau VI montre que la culture sur milieu alcoolisé avait consommé presque tout l'oxygène de l'atmosphère confinée au moment où l'on a mis fin à l'expérience; mais cela ne présente pas d'inconvénient, car le mycélium absorbe rapidement jusqu'aux dernières traces de ce gaz sans que son développement en souffre; l'ascension progressive de la colonne mercurielle dans le tube manométrique en témoigne; de plus, quand tout l'oxygène a disparu, la colonne de mercure reste stationnaire; elle traduit fidèlement les oscillations barométriques pendant des semaines et des mois, si on laisse les choses en l'état; ceci prouve que le mycélium, quoique affamé, ne libère pas le carbone de sa propre substance à l'état d'acide carbonique, en l'absence d'oxygène; et cependant, on sait qu'un végétal affamé est le siège de transformations diastasiques actives qui portent sur les matières albuminoïdes.

Puisqu'on n'observe pas de dégagement d'acide carbonique, il faut en conclure que les diastases capables de dégrader les matières azotées, en l'absence d'oxygène, ne peuvent pas produire d'acide carbonique; la zymase n'a pas son analogue parmi les diastases des matières quaternaires de l'eurotiopsis Gayoni. C'est une observation que j'ai déjà faite chez le pois; il semble donc qu'elle soit générale chez les végétaux aérobies.

Lorsque les cultures en milieu sucré sont privées d'oxygène, la fermentation alcoolique apparaît; on constate un dégagement d'acide carbonique qui se poursuit tant qu'il reste du sucre, mais quand il est complètement terminé, on observe l'état stationnaire indéfini de la colonne mercurielle dans le tube manométrique.

Pour obtenir des résultats probants avec les milieux sucrés, il faut mettre fin aux expériences avant que l'oxygène ait été consommé. Les chiffres du tableau VI montrent que cette condition a été réalisée dans l'expérience dont j'ai donné les résultats.

Parmi les chiffres qui doivent attirer l'attention dans le tableau V, ce sont ceux qui donnent la valeur du quotient respiratoire qui sont les plus importants. Le chiffre 1,17 fourni par la culture en milieu sucré est légèrement supérieur au chiffre réel pour la raison que j'ai déjà donnée; mais il n'en est pas moins vrai que si on le compare au chiffre 0,508 fourni par la culture en milieu alcoolisé, on constate qu'il existe entre eux la relation prévue. Nous avons donc ici un argument de plus à ajouter à ceux, déjà nombreux, que nous avons recueillis en faveur de la thèse soutenue dans ce travail; mais celui-ci présente l'avantage d'être dégagé de toute complication relative à la présence de matières quaternaires. Il prouve une fois de plus que l'absorption d'oxygène ne commence qu'à partir du moment où le sucre est déjà dédoublé en alcool et acide carbonique; cela revient à dire que l'alcool s'accumule dans les milieux de culture ou dans les tissus végétaux parce que la cellule ne peut pas l'utiliser en l'absence d'oxygène, ou encore que le dédoublement du sucre en alcool et acide carbonique est une transformation physiologique dont le but immédiat est de préparer l'assimilation de la fraction utilisable du sucre.

A côté de ces résultats, j'ai mis en relief, dans le tableau V, quelques autres données qui semblent constituer des caractères distinctifs des deux modes d'alimentation. Ce sont les quantités d'acide carbonique et d'oxygène dégagé ou absorbé par l'unité de poids de culture, dans l'unité de temps.

Les chiffres ne présentent cependant rien de précis, en ce qui concerne l'oxygène; par contre, ils semblent fournir au sujet de l'acide carbonique une indication utile; il n'y a pour-

tant là qu'une simple coïncidence; et comme je vais maintenant passer à l'examen de ces irrégularités, qui peuvent se traduire quelquefois par des régularités accidentelles, je dois dire que l'on ne peut pas non plus accepter sans réserves les notions de même ordre fournies par les tableaux I et II.

Quelle importance faut-il accorder à la durée des cultures et au poids du mycélium obtenu, dans l'usage provisoire que j'en ai fait? La notion de temps et de poids, employée telle quelle, ne fournit aucun renseignement précis.

On conçoit, en effet, que le poids de mycélium obtenu dans un temps donné ne peut être comparable d'une expérience à l'autre qu'autant que l'on opère avec un même milieu et dans des conditions identiques; il ne l'est plus dès que la durée des cultures varie. C'est qu'en effet le poids de la culture n'est pas proportionnel au temps, et, d'un autre côté, il n'y a aucune raison d'admettre que la dépense d'entretien des cellules formées est constante d'un bout à l'autre de l'expérience, au contraire.

On n'est donc pas fondé à tirer des conclusions précises de données qui ne peuvent en fournir; et si on le fait quand même, on tombe dans l'arbitraire.

Le poids final de la culture n'est pas mieux défini que le temps; ce n'est pas la somme de substance vivante obtenue qui a consommé pendant toute la durée de l'expérience; la dépense d'entretien est due à un poids de mycélium variable d'un instant à l'autre.

Je condamne ainsi, en apparence, un procédé de raisonnement que j'ai appliqué aux végétaux supérieurs dans le premier mémoire; mais là, les conditions de croissance sont différentes; le développement peut être considéré comme à peu près proportionnel au temps, tant que les réserves ne sont pas épuisées; de sorte que si les augmentations de poids des plantules dans l'unité de temps, suivant les espèces végétales, sont entre elles comme 1, 2, 3, etc... par exemple, les poids définitifs à la fin de l'expérience seront également proportionnels à 1, 2, 3, etc... de sorte que les résultats présentent entre eux des rapports constants, et cela suffit lorsqu'on établit seulement des comparaisons.

Pour arriver à interpréter convenablement les résultats fournis par l'eurotiosis, il faut définir plus exactement ce

qu'est le poids d'une culture et préciser davantage la notion de temps.

III

M. Duclaux a symbolisé par une formule le travail de la vie cellulaire¹. Les aliments servent à la construction des cellules ou à leur entretien. Si on désigne par S la somme des aliments consommés par une culture d'eurotiopsis, par C la quantité employée à la construction du végétal, E celle qui est affectée à l'entretien, ces trois quantités sont liées par la relation suivante :

$$S = C + E.$$

C peut être mis sous la forme $a P$, P étant le poids de mycélium obtenu à la fin de l'expérience, et a un coefficient exprimant la quantité d'aliment employé à la construction de l'unité de poids de plante.

E dépend du temps et du poids P, on peut donc faire :

$$E = b \frac{P}{n} t.$$

$\frac{P}{n}$ est ce que l'on peut appeler le poids moyen de la culture, c'est-à-dire une quantité constante pendant toute la durée de l'expérience qui consomme pour son entretien la même somme d'aliment que la culture elle-même.

La dépense d'entretien calculée à l'aide du poids moyen est donc proportionnelle au temps, ce qui justifie l'expression précédente; b est la dépense d'entretien par unité de poids et de temps.

De sorte qu'en définitive on a :

$$S = a P + b \frac{P}{n} t. \quad (4)$$

C'est la formule proposée par M. Duclaux.

Pour éviter les complications de calcul, je considérerai S comme représentant seulement la somme des aliments ternaires qui ont contribué à l'alimentation de l'eurotiopsis; comme P est constitué en partie, à peu près 5 0/0, par de l'azote emprunté à l'ammoniaque et à l'acide nitrique, les coefficients a et b , déduits par le calcul, seront inférieurs aux coefficients réels, puisque le

1. *Traité de microbiologie*, t. I et III, Masson, Paris.

premier membre ne renferme pas l'azote utilisé; mais ils demeureront comparables entre eux d'une expérience à l'autre.

M. Duclaux a appliqué cette formule à l'étude des résultats fournis par M. Laborde sur l'alimentation hydrocarbonée de l'eurotiopsis, et pour cela, faute de renseignements, il a considéré n comme égal à 3, chiffre déduit par M. Hansen de l'étude de la multiplication de la cellule de levure.

Il a admis en outre, comme conséquence de la revision méthodique des notions apportées par l'étude de la vie de la levure, que a doit être voisin de 2 pour la levure, 2 étant cependant une valeur approchée par excès; pour l'eurotiopsis, il a fait $a = 1,5$.

Je n'ai pas besoin d'entrer dans de longues explications pour faire comprendre que, d'après les notions acquises dans le cours de ce travail, on doit trouver pour b la même valeur, que le champignon soit nourri de sucre ou d'alcool, puisque les deux modes d'alimentation se confondent; mais ce n'est pas S qu'il faut employer dans le cas du sucre, mais bien $\frac{S}{2}$ puisque la moitié du poids du sucre est perdue pour la cellule, à l'état d'acide carbonique. D'autre part, l'expérience nous apprend que $a = 1$ pour l'alcool.

Cette formule se prête donc à une nouvelle vérification des conclusions tirées de mes expériences.

J'utiliserai d'abord les éléments de calcul fournis par les résultats de M. Laborde. (V. Duclaux, *loc. cit.*) Ce sont les suivants :

Nature de l'aliment.	Valeur de S .	Valeur de P .	t .
Sucre interverti.....	100	29	6
Alcool.....	100	44	12

En portant ces chiffres dans la formule

$$S = a P + b \frac{P}{3} t.$$

et en faisant $a = 1$ puisque l'alcool est la fraction utilisée, on a :

$$\text{Pour le sucre } 50 = 29 + b \frac{29}{3} \cdot 6 \text{ d'où } b = 0,27$$

$$\text{Pour l'alcool } 100 = 44 + b \frac{44}{3} \cdot 12 \text{ d'où } b = 0,31$$

Ces chiffres, comme on le voit, sont suffisamment voisins pour justifier les prévisions; on n'a pourtant pas le droit d'y

voir autre chose, pour le moment, qu'une simple coïncidence, et voici pourquoi :

On a admis que $\frac{P}{n}$ est égal à $\frac{P}{3}$; c'est une supposition manifestement erronée : les cultures d'eurotiopsis n'augmentent pas suivant la même loi que la levure ; le développement est lent au début, mais quand le mycélium recouvre complètement la surface du liquide d'un mince voile dont les filaments s'élèvent de quelques millimètres dans l'air, l'accroissement du poids de la culture devient extrêmement rapide ; si donc, on veut tirer parti de cette formule si avantageuse, il faut déterminer par l'expérience la valeur du poids moyen $\frac{P}{n}$ pour chaque aliment offert au champignon.

J'ai fait cette détermination pour le sucre interverti et pour l'alcool. Les milieux additionnés de sucre interverti à la dose de 5 0/0 étaient placés dans des fioles coniques de 250 c. c. à raison de 50 c. c. par récipient ; on introduisait dans chaque récipient la même quantité de semence formée par des spores recueillies sur une culture jeune et soumises à une germination préalable de 24 heures. Les cultures ont été faites à la température de 30°.

L'alcool était offert à la concentration de 3 0/0 ; mais on n'utilisait que 25 c. c. de liquide au lieu de 50, et on prenait toutes les précautions possibles pour réduire les pertes par évaporation et pour évaluer celles qui se produisaient quand même.

On prélevait à des intervalles indiqués dans les tableaux ci-dessous une culture de la série : on déterminait le poids de mycélium fabriqué et la quantité d'aliment consommé. Pour obtenir des résultats aussi comparables que possible, on écartait soigneusement toutes les cultures qui présentaient la moindre irrégularité dans la formation du voile.

Le tableau VII résume les résultats relatifs au sucre interverti ; le tableau VIII a été obtenu avec les cultures en milieu alcoolisé.

TABLEAU VII

N ^{os} d'ordre.	Durée de l'expérience jours et heures.	Poids du mycélium mgr.	Sucre consommé mgr.	Rendement p. 100.
1.	2 j.	11,2	—	—
2.	2 j. 15 h.	38,8	100,6	38,56
3.	3 — 3 —	129,1	385,5	33,48
4.	3 — 15 —	182	537,7	33,8
5.	4 — 3 —	260,1	811,5	32
6.	5 — 15 —	386,8	1289,5	30,71
7.	6 — 15 —	452,3	1651,3	27,4

TABLEAU VIII

ALCOOL

1.	3 j. 16 h.	12,8	—	—
2.	4 — 16 —	42	42	—
3.	5 — 16 —	153	192	79,68
4.	6 —	227,7	325	70.
5.	6 — 16 —	342,3	640	53,48

Des courbes traduiront, mieux que les chiffres, la marche générale du développement des cultures; la courbe figure 1 représente le tableau VII; la courbe figure 2 correspond au tableau VIII; elles traduisent la loi du développement dans le

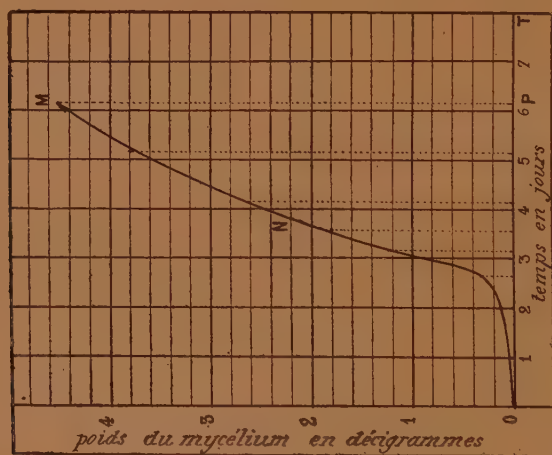


Fig. 1. — Développement de l'Eurotiopsis sur milieu sucré.

temps; on peut se convaincre aisément que ces courbes s'écartent beaucoup de la forme parabolique.

Elles permettent aussi de juger de l'allure tout à fait différente des cultures suivant qu'on leur offre du sucre ou de l'alcool; à ce point de vue, elles matérialisent les diverses obser-

vations que j'ai signalées dans le cours de ce mémoire, concernant le temps mort du début, la proportionnalité du développe-

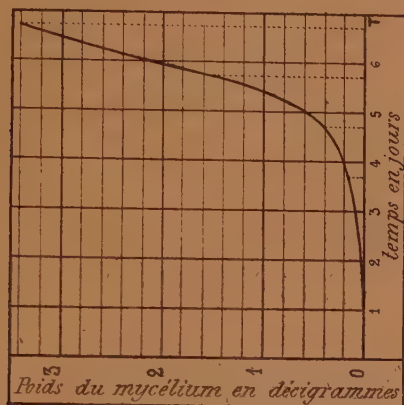


Fig. 2. — Développement de l'Eurotium sur milieu alcoolisé.

ment au temps, la vitesse de l'accroissement de poids, etc. ; elles montrent en effet combien les cultures sur alcool sont pénibles au début, bien que la semence ait été fournie au même état de développement que celle qui a servi pour les cultures en milieu sucré, et qu'on ait pris la précaution de réduire de moitié le volume du liquide de culture, afin de diminuer autant que possible la durée du temps mort ; mais une fois le voile formé, l'accroissement de poids ne le cède en rien aux cultures sur milieu sucré.

Les courbes se comprennent d'elles-mêmes ; elles vont nous fournir le poids moyen des cultures ; considérons, en effet, l'aire OPMN ; elle est proportionnelle à la dépense d'entretien de la culture 7 (voir Duclaux, *loc. cit.*, t. III, p. 61) ; or cette aire est équivalente au rectangle qui a pour base OP et pour hauteur l'ordonnée moyenne de la courbe ; c'est donc cette ordonnée moyenne de la courbe qui est le poids moyen cherché ; l'aire OPMN s'obtient assez exactement, par l'emploi d'un certain nombre de méthodes ; j'ai appliqué dans le cas actuel la méthode de Simpson ; connaissant l'aire OPMN et la base OP du rectangle équivalent, on en déduit le poids moyen de la culture 7 ; on comprend que l'on puisse obtenir aussi facilement les poids moyens correspondant aux cultures 6, 5, 4, etc., en considérant les portions de courbe relatives à ces cultures. Le

rapport de l'ordonnée moyenne à l'ordonnée maximum fournit les valeurs $\frac{1}{n}$. Voici les chiffres obtenus de cette façon, pour les cultures en milieu sucré et alcoolisé :

TABLEAU IX

Sucre interverti.		Alcool.	
Culture n° 4.....	0,20	Culture n° 3.....	0,41
— n° 5.....	0,24	— n° 4.....	0,44
— n° 6.....	0,32	— n° 5.....	0,46
— n° 7.....	0,37		

Si on porte ces valeurs dans la formule I, et qu'on y fasse $1/n = 0,20, 0,24$, etc., on obtiendra les valeurs correspondantes de b ; j'ai fait ce calcul en admettant que la quantité d'aliment utilisé S représente seulement la moitié du poids de sucre consommé. En faisant le même calcul pour les cultures en milieu alcoolisé, on en tire également les valeurs de b relatives à ces cultures.

Le tableau X donne les différentes valeurs ainsi calculées :

TABLEAU X

Sucre interverti.		Alcool.	
Culture n° 4.....	0,65	Culture n° 3.....	0,40
— n° 5.....	0,43	— n° 4.....	0,67
— n° 6.....	0,34	— n° 5.....	0,81
— n° 7.....	0,33		

Les deux séries de chiffres du tableau X ne présentent, comme on le voit, aucune relation l'une avec l'autre, ou tout au moins elles sont complètement différentes du résultat auquel on pensait aboutir ; on peut traduire ce résultat de la façon suivante : l'eurotiopsis cultivé sur milieu sucré consomme, pour son entretien, des quantités décroissantes d'aliments avec le

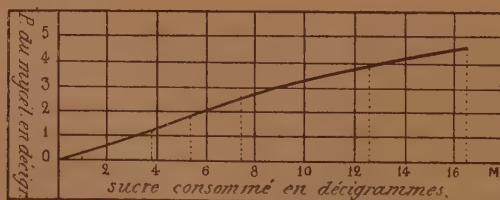


Fig. 3. — Courbe du rendement (milieu sucré.)

temps ; nourri avec de l'alcool, il dépense, pour son entretien, des rations alimentaires qui vont en croissant avec le temps.

Nous sommes ainsi bien loin de la concordance observée dans les chiffres fournis par l'exemple tiré des données de M. Laborde; cela tient à ce que la valeur du poids moyen $P/3$,

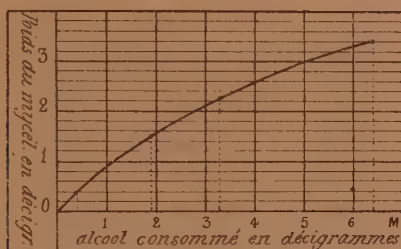


Fig 4. — Courbe du rendement (milieu alcoolisé).

dont nous avons fait usage, s'accorde très bien avec le chiffre réel fourni par l'expérience dans le cas de l'alimentation hydrocarbonée, mais s'éloigne au contraire beaucoup de celui que l'on obtient lorsqu'on offre de l'alcool au champignon.

Si singuliers que ces résultats paraissent, nous les avons déjà enregistrés, mais sous une forme beaucoup moins frappante, de sorte qu'ils n'ont pas attiré l'attention. Je les ai traduits dans le rendement des tableaux I et II; et ici ils constituent un mode d'expression des valeurs du rendement des tableaux VII et VIII. Avec les cultures en milieu sucré, le rendement décroît de 38,56 à 27,4 en 4 jours, tandis qu'avec les cultures en milieu alcoolisé, il baisse en 1 jour de 79,68 à 53,48. Les courbes figure 3 et figure 4 traduisent ces variations. Le rendement est le rapport de l'ordonnée à l'abscisse correspondante.

Au point de vue physiologique, ces résultats signifient que l'eurotiopsis soumis à l'alimentation hydrocarbonée vieillit très vite, car une cellule qui consomme activement doit être considérée comme plus robuste, plus jeune qu'une autre où les échanges nutritifs sont très ralentis. L'alcool semble produire un effet inverse sur l'activité des cellules: plus elles vieillissent, plus elles consomment, du moins en apparence.

Je ne puis rattacher ces faits qu'à l'influence de l'aération, qui se traduit, pour ainsi dire, d'une manière inverse, sur les deux modes d'alimentation.

Dans le cas de l'alimentation hydrocarbonée, le mycélium

émerge très rapidement; mais les filaments aériens restent courts; quand le champignon est nourri d'alcool, son développement est extrêmement pénible au début; mais quand le voile est bien formé, les filaments aériens s'allongent relativement beaucoup. Au point de vue de ses relations avec l'air ou le liquide, la culture se divise donc en deux parties: la partie aérienne et la partie immergée; c'est celle-ci qui se forme la première; elle est placée dans des conditions défavorables pour consommer l'alcool; les cellules qui la composent en absorbent donc peu; la portion aérienne est placée, au contraire, dans les meilleures conditions pour le consommer activement; et plus elle augmente par rapport à la première, plus la dépense d'entretien s'accroît. C'est donc en apparence, seulement, que les cellules semblent se rajeunir; la relation si étroite de l'alimentation en alcool avec les exigences en oxygène n'apparaît pas ici pour la première fois; on l'a observée également avec le pois, 1^{er} mémoire p. 203; mais la façon dont elle se manifeste dans le cas de l'eurotiopsis montre qu'un végétal aérobie est incapable de se nourrir d'alcool s'il n'est pas en rapport direct avec l'oxygène libre; s'il ne dispose que de l'oxygène dissous, il végète très péniblement, même lorsque l'alcool constitue pour lui un aliment de 1^{er} ordre.

En ramenant à l'influence de l'air les différences dans le mode de développement de l'eurotiopsis, suivant qu'il est nourri de sucre ou d'alcool, je ne fais qu'un rapprochement; la raison nous échappe jusqu'à présent; mais il est clair que la cause essentielle de ces différences tient à la présence de la zymase ou à son absence.

Lorsque le champignon est cultivé sur milieu sucré, la zymase est pour lui une diastase indispensable; quand on lui offre de l'alcool, il n'en a plus besoin; mais la zymase est une diastase très oxydable, autant du moins que Buchner l'a montré; si elle disparaît au bout d'un certain temps, les cellules qui en sont privées ne doivent plus avoir qu'une action très limitée ou nulle sur le sucre; elles sont affamées, et dès lors elles brûlent leur propre substance à l'exemple de toutes les cellules privées d'aliments. Nous arrivons ainsi une fois de plus à admettre que la zymase, contrairement à toutes les conceptions actuelles, est une diastase normale chez les végétaux, qui prend nais-

sance comme toutes les autres diastases cellulaires, pendant la vie végétative. Si elle persiste dans la vie anaérobie, c'est parce qu'elle se détruit plus ou moins vite suivant les espèces végétales; elle doit être toujours présente dans les cellules jeunes d'eurotiopsis, quoique développées au large contact de l'air. Il en est de même chez les levures; mais, par contre, l'aspergillus nous apparaît, ainsi que les végétaux supérieurs, comme des organismes où la zymase s'oxyde avec la plus grande facilité, si bien qu'on n'en trouve jamais que des traces.

Toutes ces déductions seront vérifiées, point par point, dans un autre mémoire. Pour le moment, je vais résumer les recherches relatives au vieillissement des cultures; cette étude permettra d'élucider quelques points que j'ai laissés dans l'ombre, en même temps qu'elle fournira quelques renseignements au sujet de la variation de la composition élémentaire du mycélium d'eurotiopsis.

IV

Le mycélium d'eurotiopsis est relativement riche en matières saccharifiables. Pour les évaluer, j'ai soumis les cultures pulvérisées, à l'état sec, avec du sable très fin, à l'action de l'acide sulfurique à 20/0, à la température de 120° pendant 20 minutes; les corps réducteurs obtenus de cette façon ont été dosés par la méthode de Lehmann, modifiée par Maquenne.

Le tableau XI donne les résultats obtenus avec des cultures développées sur milieux sucré et alcoolisé. Pour entourer ces résultats de tous les renseignements utiles, j'ai fait les évaluations sur les cultures des tableaux VII et VIII. Voici les chiffres qu'elles ont fournis :

TABLEAU XI

Désignation des cultures.		Matières saccharifiables p. 100 de poids sec.
Milieu sucré.	{ Cultures 6 + 7 tableau VII.....	24,3
	{ Culture de 3 jours.....	48,87
Milieu alcoolisé.	{ Cultures 4 + 5 tableau VIII.....	16,41
	{ Cultures 6 + 6 tableau VIII.....	24,78
	{ Autre culture conservée 18 jours à l'étuve à 30°.....	
	{ Après la disparition de l'alcool.....	42,58

Plus la culture vieillit, plus la quantité de matières saccharifiables augmente, et la production des matières hydrocarbonées se poursuit activement en l'absence de tout aliment; cela prouve que ces substances prennent naissance par voie de désassimilation; or ces composés présentent beaucoup d'analogie avec les celluloses vraies; parmi eux, une certaine portion doit d'ailleurs provenir de ces dernières; je n'ai pas suivi les conventions établies pour séparer ces matières saccharifiables des celluloses vraies; j'ai forcé un peu la dose d'acide.

C'est là une observation intéressante, car les physiologistes admettent unanimement que les celluloses dérivent du sucre par un phénomène de condensation moléculaire, dont l'amidon est un autre exemple, à un état de polymérisation moins avancée.

Pour ce qui est des cultures en milieu alcoolisé, le doute n'est pas possible, au sujet de l'origine qu'elles assignent aux celluloses; car le mycélium n'y a jamais disposé d'une seule molécule hydrocarbonée en dehors de celles qu'il s'est constituées, et nous verrons plus loin qu'il ne fabrique pas de glycogène.

Quant aux cultures qui se sont développées aux dépens du sucre, elles doivent tout naturellement élaborer les enveloppes cellulosiques du mycélium par la condensation du sucre; c'est encore une illusion; la diminution de la dépense d'entretien *b* avec l'âge de la culture montre que le mycélium relativement jeune consomme peu de sucre; j'ai même ajouté qu'il n'en absorbe pas du tout, et je l'établirai par l'étude de l'apparition et de la destruction de la zymase; mais cela n'empêche pas que dans les cellules dépourvues de zymase, les matières saccharifiables augmentent avec l'âge, exactement comme dans les cultures en milieu alcoolisé, après la disparition complète de l'alcool. On doit donc admettre qu'ici encore, ces corps se forment par voie de désassimilation des matières albuminoïdes.

Ainsi, la physiologie assigne aux celluloses une origine toute différente de celle de l'amidon, si toutefois on peut se permettre de généraliser l'exemple de l'eurotiopsis; on comprend donc qu'elles puissent être constituées par des polymères des sucres en C^5 et C^6 , unis à d'autres substances que l'on ne connaît pas, car la saccharification des celluloses fournit des corps résiduels non encore définis, tandis que l'amidon issu des

glucoses se résout toujours, en son constituant, le dextrose.

La formation des membranes cellulósiques est une fonction normale et nécessaire des cellules végétales; mais elle caractérise surtout la période de dégénérescence, celle où le protoplasma, privé d'aliment ou incapable d'utiliser celui dont il dispose, s'oxyde ou se détruit rapidement, faisant ainsi passer la cellule de la fonction active de multiplication à la fonction passive d'organe de soutien ou de transport; et plus la cellule vieillit vite, et plus économiquement elle remplit son rôle.

La désassimilation des matières azotées n'est pas accompagnée seulement de production de substances cellulósiques; il y a également appauvrissement du mycélium en azote et perte de carbone et d'hydrogène par voie d'oxydation.

Voici, pour donner une idée de l'activité de ces phénomènes, quelques chiffres fournis par des cultures en milieu alcoolisé, appartenant à la même série que celles du tableau VIII, mais qui avaient été conservées à l'étuve, longtemps après la disparition complète de l'alcool.

Le n° 1 a été arrêté à peu près au moment où les dernières traces d'alcool venaient d'être absorbées.

TABLEAU XII

Nos d'ordre.	Age des cultures jours et heures.	Poids du mycélium mgr.	Perte de poids calculée d'après le n° 1 mgr.	Poids de l'extrait mgr.	Augmentation de l'extrait calculée d'après le n° 1 mgr.
1.	6,17	329,7	—	86,8	—
2.	7,17	303	21,7	92,6	5,8
3.	15	227	102,7	95,8	9
4.	25	195	134,7	108	21,2
		199	130,7	108	21,2

Le tiers du poids des cultures a disparu au bout de 25 jours, à l'état d'acide carbonique et d'eau, pendant que l'extrait a augmenté seulement de 2 centigrammes; les matières saccharifiables ont passé de 24,78 à 42,58 0/0 (V. tableau XI). Le taux de l'azote voisin de 6 est tombée à 3 0 0 environ; ce sont donc les résidus azotés de la désassimilation qui ont contribué à l'augmentation de l'extrait.

Mais ces faits ne comprennent pas toute l'histoire du vieillissement du mycélium d'eurotiopsis.

Le champignon à l'état jeune renferme beaucoup de matières oléagineuses, qui disparaissent également avec l'âge.

Le tableau XIII montre dans quelle proportion ces substances se rencontrent dans le mycélium; les cultures ont été réalisées sur milieu alcoolisé à 4 0/0; le n° 3 a été conservé dans des conditions de vie anaréobie, pendant 28 jours, à partir du moment où le n° 1 a été arrêté.

Pour évaluer les matières grasses, j'ai pulvérisé le mycélium à l'état sec avec du sable silicieux; l'épuisement a été fait avec de l'éther sec.

TABLEAU XIII

Nos d'ordre.	Désignation des cultures.	Durée de conservation.	Matières grasses p. 100 de poids sec.
1.	Témoin	—	20,78
2.	Culture à l'air	28 jours.	2,62
3.	Culture anaérobie	28 —	21,48

La disparition des matières grasses à l'air est susceptible d'apporter quelque complication au mécanisme de formation des celluloses, tel que je l'ai expliqué plus haut; il se peut que les matières azotées fournissent indirectement les matières cellulosiques en passant par l'intermédiaire des substances oléagineuses; je n'ai pas eu le loisir d'approfondir les relations entre les trois catégories de composés — matières albuminoïdes, matières grasses et substances hydrocarbonées; l'intérêt que présente cette question mérite qu'on y revienne.

Les observations faites dans le cours de ce chapitre vont nous permettre de reprendre la critique des chiffres du tableau III. Ils présentent, en effet, une anomalie dont je n'ai pas encore fourni l'explication. Mais avant d'insister sur ce point, je dois dire que l'intérêt du rapprochement en question, qui était plausible au moment où il a été fait, ne présente plus qu'un attrait historique. J'ai montré, en effet, dans la suite, que le mycélium d'eurotiopsis demeure capable de consommer de l'alcool, beaucoup plus longtemps qu'il n'est apte à absorber du sucre; il en résulte que tout en conservant une composition relativement plus constante, le mycélium brûle plus complètement l'alcool, si bien que dans la façon de traduire les résultats, adoptés dans le tableau III, on retrouve plus exactement l'origine de l'acide carbonique avec les cultures faites sur milieu alcoolisé, qu'avec celles qui se sont développées aux dépens du sucre; celles-ci ont subi dans leur constitution des modifica-

tions plus profondes par voie de désassimilation, et lorsqu'on les considère comme formées d'alcool et d'ammoniaque, on est loin de la réalité. La justesse de cette critique est appuyée par la comparaison des chiffres du tableau XIV ; il en résulte que l'écart entre les chiffres obtenus par le calcul et ceux qui sont fournis par l'expérience doit être mis sur le compte de la perte de carbone par la désassimilation des matières albuminoïdes ; l'azote éliminé entraîne avec lui une certaine fraction de carbone qui se trouve dans le liquide de culture, et c'est pour cela que cet élément s'obtient intégralement dans le bilan que j'ai dressé p. 354.

Mais à côté de cette interprétation, il y en a une autre qui vient également à l'esprit ; elle s'appuie sur la présence possible d'une certaine réserve de glycogène dans le mycélium d'eurotiosis. Si le champignon emmagasinait le sucre à l'état de glycogène, on devrait retrancher du sucre consommé la portion employée à constituer cette réserve, de même qu'il faudrait diminuer d'autant le poids du mycélium obtenu ; car ce sucre n'a pas été assimilé, et dans mes calculs j'ai admis le contraire.

J'ai cherché vainement à établir le bien-fondé de cette supposition. La réaction micro-chimique de l'iode ne peut fournir de garantie sérieuse, car le contenu du mycélium âgé de deux ou trois jours se résout en une masse granuleuse dont les éléments se colorent, plus ou moins fortement, en jaune par l'iode.

J'ai soumis au traitement à l'eau bouillante pendant 6 heures du mycélium pulvérisé aussi finement que possible ; le liquide filtré et traité par l'acide sulfurique à 2 0/0 à 120° pendant 20 minutes a fourni seulement, en matières réductrices évaluées en glucoses, 2 0/0 du poids du mycélium traité. Ce chiffre est trop faible pour être rapporté à des substances autres que les matières gommeuses qui se dissolvent peu à peu dans l'eau bouillante. Cette épreuve, que j'ai répétée plusieurs fois sur plusieurs échantillons de cultures jeunes obtenues sur des milieux à 5 et 10 0/0 de sucre, ne m'a jamais fourni de résultat plus concluant ; et cependant la culture qui a donné, dans ces conditions, 2 0/0 de substances réductrices renfermait 18,87 0/0 de matières saccharifiables.

La démonstration de l'absence de glycogène est plus facile à faire avec des cultures obtenues sur milieu alcoolisé. Je l'ai

faite d'une manière indirecte sur la culture n° 3 du tableau XIII.

Lorsque le ballon dont l'atmosphère interne avait à peu près 1 litre de capacité a été bouché, la disparition de l'oxygène aurait dû être suivie d'une fermentation lente du glycogène, comme cela se produit avec la levure; mais je n'ai jamais observé la moindre dénivellation du niveau du mercure dans le tube à dégagement dont le bouchon était muni, après l'absorption complète de l'oxygène qui, avec une culture ayant fourni 2 grammes de matière sèche, à la fin de l'expérience, devait être complète au bout de 2 h. 40, d'après les données du tableau IV. Le mycélium d'eurotiopsis ne renferme donc pas de quantités sensibles de glycogène. C'est bien aux modifications causées par le vieillissement qu'il faut rapporter la contradiction relevée dans les chiffres du tableau III.

L'absence de glycogène va nous permettre de traduire par la composition élémentaire du mycélium les changements survenus dans la constitution de la substance vivante, suivant l'âge des cultures. Le tableau XIV les synthétise assez fidèlement; j'y ai réuni les chiffres relatifs à la composition centésimale d'un certain nombre de cultures dont l'histoire a été faite dans le cours de ce mémoire.

TABLEAU XIV

	Milieu sucré.		Milieu alcoolisé.				
	1	2	3	4	5	6	7
	Culture de 2 jours. Mycélium de 24 h.	Culture 3. Tableau I.	Culture 3. Tableau II.	Culture 4. Tableau XII.	Culture 1. Tableau XIII.	Culture 2. Tableau XIII.	Culture 3. Tableau XIII.
C.	56,48	51,67	50,45	43,99	53,38	46,86	54,23
H.	9,4	7,74	7,21	7,04	7,86	7,07	7,9
Az.	6,63	4,84	5,55	2,88	5,74	3,46	2,26
O + S	27,79	35,75	36,74	46,09	33,02	42,61	35,61

Je n'ai pas tenu compte des cendres; elles sont d'ailleurs négligeables, elles représentent seulement 1 à 2 0/00 du poids du mycélium; le liquide Raulin ne renferme en effet que des quantités très petites d'éléments minéraux non volatils au rouge.

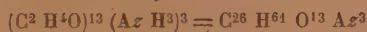
Ces chiffres se prêtent encore à une vérification importante, indépendamment des renseignements qu'on leur a demandés.

Puisque le sucre ne fournit à l'eurotiopsis que la fraction de molécule qui se résout en alcool, il en résulte que la composition du mycélium, formé en apparence de sucre et d'ammoniaque, ne

doit présenter aucun rapport de constitution avec le sucre ; par contre on doit lui retrouver, à peu de chose près, la même composition centésimale que l'alcool uni à une proportion d'azote ammoniacal, déterminée par l'analyse.

Dans une note que j'ai communiquée à l'Académie des sciences¹, j'ai montré qu'il en est bien ainsi, mais on est en mesure ici d'approfondir un peu plus ce point particulier. On comprend qu'il n'est pas indifférent de s'adresser à la première culture venue, pour établir ce rapprochement ; les modifications causées par l'autophagie de la portion la plus âgée du mycélium sont assez importantes pour imposer le choix de cultures très jeunes, si l'on veut se faire une idée aussi exacte que possible des rapports des éléments empruntés à l'alcool et à l'ammoniaque pour édifier la substance vivante telle qu'elle se présente avant d'avoir été transformée par le travail d'entretien. J'examinerai donc les chiffres fournis par la culture 1 du tableau ci-dessus. Cette culture a été obtenue sur un milieu à 10 0/0 de sucre ; elle a été arrêtée 24 heures après l'apparition des premiers filaments aériens ; on a donc ainsi quelques chances d'opérer sur des cultures peu dégénérées, et par suite de composition à peu près homogène ; de plus, j'ai forcé à dessein la dose de sucre, afin de montrer que l'oxygène des hydrates de carbone ne se retrouve pas dans la substance vivante.

La combinaison imaginaire d'aldéhyde et d'ammoniaque (on verra tout à l'heure pourquoi je prends l'aldéhyde), qui répond à la condition imposée par l'analyse de contenir 6,63 0/0 d'azote environ, est de la forme



et présente la composition centésimale suivante ; j'ai placé en regard de ces chiffres ceux qui expriment la composition du mycélium jeune de la culture déjà indiquée :

TABLEAU XV

	C ²⁶ H ⁶¹ O ¹³ Az ³	Culture 1. Tableau XIV.
C.....	50,08	56,48
H.....	9,79	9,1
Az.....	6,74	6,63
O.....	33,38	27,79

On voit que l'hydrogène et l'oxygène sont en excès, dans le composé aldéhydrique hypothétique. Pour l'hydrogène, cela se conçoit; l'ammoniaque perd de l'hydrogène en se fixant sur un radical organique; on sait d'ailleurs que les substances albuminoïdes ne renferment que des groupements azotés, moins hydrogénés que l'ammoniaque; mais on s'explique moins facilement la disparition de l'oxygène, car on est volontiers porté à admettre que la cellule vivante possède la faculté de faire intervenir l'oxygène libre dans les conditions de vie aérobie, au cours du travail d'organisation des matières protoplasmiques. Les faits semblent établir, au contraire, que l'excédent d'hydrogène apporté par l'ammoniaque s'élimine en entraînant une partie de l'oxygène emprunté à l'aldéhyde pour former de l'eau.

Voilà ce que l'on peut déduire des chiffres qui précèdent. Cependant, ce que j'ai dit au sujet de l'organisation de la matière vivante semble laisser entendre qu'elle se crée de toutes pièces en partant de composés très simples par une série de migrations d'atomes, et ce n'est qu'au moment où ce travail de synthèse a abouti aux substances protoplasmiques que les aliments prennent part à l'entretien de la vie.

Cette conception ne me paraît pas susceptible d'expliquer les manifestations extérieures du travail protoplasmique. La division du travail cellulaire en travail de construction et d'entretien est une spécialisation imaginaire, simple et commode pour la dissociation des idées, en même temps que très avantageuse au point de vue pédagogique; mais il ne faut pas la considérer comme une traduction de la réalité.

On comprend, en effet, que l'édifice moléculaire d'une substance protoplasmique puisse ne jamais se créer de toutes pièces; la semence qui l'a hérité de ses ancêtres le transmettra à ses descendants. Quand la germination commence, c'est le travail d'entretien qui apparaît; de sorte que la vie semble se manifester d'abord par un processus de désassimilation qui donne naissance à de l'acide carbonique, de l'eau, des hydrates de carbone insolubles, des matières grasses, des résidus azotés, etc.; cette usure réduit l'édifice moléculaire initial, l'entame en quelque sorte de tous les côtés, et c'est pour réparer ces pertes que l'être vivant fait des emprunts incessants aux aliments dont il dispose; mais il ne les prend pas sous les formes

où ils se présentent; il les prépare par un travail de digestion, les disloque, provoque des ruptures qui font naître des fonctions chimiques nouvelles douées de grandes affinités qui leur permettent de se combiner à l'édifice initial, de contrebalancer ses pertes, d'augmenter son poids. C'est dans ce dernier cas qu'il y a multiplication cellulaire et accroissement de substances vivantes.

Cette vue suppose que l'aldéhyde et l'ammoniaque préalablement unis ne franchiraient pas les degrés successifs d'une série de synthèses qui aboutiraient à la constitution des matières protéiques, mais s'uniraient au contraire, indépendamment l'une de l'autre, à la molécule albuminoïde, et c'est pour cela qu'on les retrouverait non pas en nature, mais en poids, à peu de chose près, dans le mycélium jeune.

Quoi qu'il en soit, la composition élémentaire de la cellule n'est jamais identique à elle-même d'un moment à l'autre; le résultat des modifications qu'elle subit consiste en un enrichissement en oxygène et en un appauvrissement en carbone hydrogène et azote. Il arrive donc un moment où les chiffres des deux colonnes du tableau XV concordent exactement. Cela se produit quand la composition du mycélium coïncide avec celle des cultures 2 et 3 du tableau XIV. Ce sont les deux exemples que j'ai donnés dans ma note des *C. R.* (janvier 1902). On constate cependant qu'il y a toujours un excédent d'hydrogène en faveur du corps aldéhydique hypothétique; j'ai indiqué l'origine de cet excédent d'hydrogène; si j'avais considéré l'alcool comme constituant la fraction utilisée du sucre, il eût été encore bien plus considérable.

L'étude de la composition du mycélium vient donc prouver, à son tour, que l'hydrogène de la fonction alcoolique est éliminé avant l'incorporation du carbone ternaire emprunté au sucre; c'est la meilleure démonstration que l'on puisse donner de ce fait dont j'ai été conduit à admettre l'existence, à la suite de nombreuses observations relatées dans le cours de ce travail.

V

CONCLUSIONS

Les deux modes d'alimentation de l'Eurotiopsis Gayoni étudiés dans ce mémoire sont complètement identiques en principe.

L'assimilation du carbone ternaire emprunté au sucre se réduit en définitive à l'incorporation de l'aldéhyde à la substance vivante.

L'alcool est incorporé aussi à l'état d'aldéhyde éthylique; il est superflu d'ajouter que l'aldéhyde est un produit transitoire, qui, dans les conditions normales de développement, ne se rencontre jamais à l'état libre dans le mycélium ou dans les liquides de culture.

Ces conclusions sont les mêmes que celles qui ont été déduites de l'étude des végétaux supérieurs, avec cette différence que celles-ci doivent être modifiées dans le sens indiquées par celles-là : ce n'est pas l'alcool qui est la substance incorporée par les plantules, c'est l'aldéhyde.

L'étude du rendement en substance vivante, des échanges gazeux entre l'eurotiopsis et l'atmosphère, celle de la composition élémentaire du mycélium confirment ces conclusions.

Si la nutrition hydrocarbonée de l'eurotiopsis et son alimentation en alcool se confondent en principe, il existe entre elles des différences que j'ai attribuées à la présence de la zymase, nécessaire à l'assimilation du carbone emprunté au sucre, inutile lorsque l'on offre directement de l'alcool au champignon.

ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE ET CHIMIQUE DU ROUISSAGE AÉROBIE DU LIN

PAR M. L. HAUMAN

Travail du laboratoire de botanique de l'Institut agricole de Gembloux.

Le rouissage des plantes textiles est le résultat de l'action des microbes. sur les corps pectiques qui constituent les lamelles mitoyennes des fibres, et la majeure partie des membranes des parenchymes qui entourent les faisceaux fibreux.

L'étude des microbes qui interviennent dans le rouissage du lin, sous l'eau, a été entreprise par MM. Winogradsky et Friebes¹ et M. Marmier².

Pour les deux premiers observateurs, ce serait l'œuvre d'une bactérie anaérobie, tandis que le dernier a trouvé un microbe aérobie capable, au contact de l'air, de rouir du lin stérilisé.

Comme le fait remarquer M. Duclaux³, la qualité de rouir le lin ne semble pas être spécifique, mais paraît appartenir à des espèces multiples.

Telle sera la conclusion qui se dégagera des études actuelles. Elles ont pour objet non pas le rouissage sous l'eau, mais celui qui s'exécute à l'air, lorsqu'on dépose le lin à la surface des prairies ou des champs.

C'est le rouissage à la rosée ou *rorage*.

Il se pratique dans nos contrées en juillet-août et même en septembre. La filasse obtenue est de qualité moindre que dans le rouissage à l'eau ; la fibre est plus foncée, moins résistante que celle que donne le rouissage à l'eau courante.

Mais les deux procédés donnant, à cette remarque près, des résultats identiques, ils ne peuvent différer que par la nature des organismes qui en sont les agents.

1. *Comptes rendus*, t. CXXI, p. 742, 1895.

2. Cité par M. DUCLAUX, *Traité de Microbiologie*, t. IV, p. 453, 1901.

3. *Id.*, p. 454.

I

ÉTUDE DES AGENTS DU ROUISSAGE

Il fallait tout d'abord étudier la flore microbienne des tiges du lin roui. Ce fut fait par la méthode ordinaire, sur plaques de Pétri, en milieux acides et alcalins; ces analyses, plusieurs fois répétées et pour des lins de provenances différentes (Gembloux, Flandre, Hesbaye, Ardennes), ont permis de constater la présence des espèces suivantes :

Bacillus coli communis ;

Bacillus mesentericus fuscus ;

Bacillus fluorescens liquefaciens ;

Bacillus mycoides ;

Bacillus subtilis ;

Bacillus termo ;

Streptothrix Forsteri ;

Micrococcus roseus ;

Penicillium glaucum ;

Mucor mucedo ;

Cladosporium herbarum,

et des mycéliums stériles d'autres champignons.

Comme il fallait s'y attendre, ce sont là des espèces banales de l'air et de la surface du sol. Il est évident que la présence de ces divers organismes sur le lin roui n'indique pas la participation de tous dans le rouissage; les tiges examinées avaient longuement séjourné à l'air et avaient été plusieurs fois manipulées. Pourtant, l'abondance constante de certaines espèces montre leur influence prépondérante dans les phénomènes étudiés.

Il y a d'abord le *Cladosporium herbarum* qui envahit toutes les tiges et les noircit, ce qui fait croire dans les campagnes que, pour que le lin soit roui, il faut qu'il soit noir; puis, et c'est la plus abondante des bactéries, le *B. coli*, dont j'ai isolé deux formes un peu différentes. J'ai observé aussi dans mes cultures sur plaques des colonies nombreuses du *B. mesentericus*, du *B. subtilis* et du *Streptothrix*.

Ce sont les diverses races ainsi isolées qui ont été utilisées dans la suite de ce travail.

Mais quels sont, parmi ces nombreux organismes, ceux qui sont capables de rouir ?

Pour le déterminer, j'ai réalisé des rouissages en tubes par des cultures pures de ces différents microbes.

La stérilisation des tiges de lin présentait une difficulté : le chauffage ordinaire à 120° produit une dissociation des fibres, ôtant toute valeur à l'expérience qui en est l'objet.

La stérilisation à sec. au four à flamber (150°), et celle par des vapeurs d'aldéhyde formique n'ont pas donné de résultats satisfaisants. J'en suis arrivé à chauffer à l'autoclave, sans dépasser 110°, le lin mis en tube sans liquide. Trois de ces chauffages réitérés à un jour d'intervalle produisent une stérilisation parfaite, sans altérer la consistance des tiges. M. Winoogradsky relate des faits analogues dans son travail.

La question de stérilisation résolue, je me suis servi du dispositif suivant pour réaliser, *in vitro*, un rouissage aérobie, sans qu'il y eût danger d'infection. Un long tube de culture contenant le lin à rouir était fermé à l'aide d'un bouchon de liège, percé d'un trou livrant passage à un petit tube de verre. Ce bouchon était à son tour recouvert d'un épais tampon d'ouate.

Après stérilisation, pratiquée comme il a été dit plus haut, on introduisait, par le petit tube de verre, le liquide de culture (eau légèrement enrichie de bouillon ou de moût de bière, suivant la nature du microbe) et la matière d'ensemencement. Ce dispositif donnait toutes garanties de pureté et permettait d'agiter les tubes, afin de répandre sur le lin le liquide ensemencé avec les microbes à étudier.

Aux espèces énumérées plus haut, j'ai ajouté le *Sclerotinia Libertiana*, le *Botrytis cinerea* et l'*Aspergillus niger*.

Dans toutes mes expériences, avec les quatorze espèces banales indiquées, la dissociation des fibres était déjà obtenue après quinze jours. Cependant, j'ai constaté des différences d'intensité dans l'action de ces divers organismes. D'une façon générale, comme c'était à prévoir, les moisissures sont beaucoup plus actives que les bactéries : non seulement elles rouissent, mais encore elles attaquent la cellulose de la fibre, qui perd toute solidité. Le *Cladosporium herbarum* est heureusement la moins énergique, fait important, sans lequel le rouissage en prairie serait impossible.

Comme je ne recherchais pas de procédé pratique de rouissage en culture pure, je ne me suis pas attaché à comparer la valeur respective, comme agents rouisseurs, des différentes espèces. Au reste, l'intensité de l'action microbienne peut varier avec les races et avec les conditions de milieu. Toutefois, le *B. fluorescens* m'a semblé donner les plus beaux rouissages ; le *Streptothrix* attaque légèrement les fibres, comme les moisissures dont il est voisin ; enfin, l'activité du *Miccococcus roseus* est faible.

Des expériences, qui ont duré un et deux mois, montrent que l'action microbienne, même très prolongée, est presque nulle sur la cellulose des fibres. La résistance de celle-ci n'avait que faiblement diminué et jamais aussi fortement qu'avec les moisissures citées plus haut.

Il résulte donc de ce qui précède que le rouissage n'est pas dû à un agent spécifique, mais qu'au contraire tous les microbes banaux de l'air et de la surface du sol peuvent exercer cette action sur les tiges.

Il paraît, du reste, moins logique ici que partout ailleurs de pousser à l'extrême la spécificité des actions microbiennes. En effet, qu'est-ce que le rouissage, sinon le début surveillé, conduit et arrêté à point des phénomènes généraux de réduction et destruction par les microbes des matières organiques mortes ?

L'action microbienne, dans le rouissage des fibres textiles, est depuis longtemps indiscutée ; mais on pouvait se demander, et spécialement dans le rouissage aérobic, si leur action n'était pas aidée par les agents atmosphériques. L'expérience suivante tend à élucider ce point :

Deux poignées de lin ont été exposées sur une prairie, dans les conditions ordinaires du rorage ; l'une y est restée toute la durée de l'expérience, tandis que l'autre, tous les deux ou trois jours, était plongée pendant une heure dans une atmosphère d'aldéhyde formique, de manière à empêcher tout développement microbien notable. La stérilité relative des tiges a, du reste, été contrôlée plusieurs fois, au cours de l'opération, qui a duré du 23 avril au 29 mai.

Pendant ce laps de temps, le lin a eu à subir des pluies abondantes, des rosées matinales, des gelées nocturnes et la chaleur parfois très forte du soleil. Le lin non stérilisé fut com-

plètement roui, tandis que l'autre n'a pas même subi un commencement d'altération.

L'action physique des agents extérieurs est donc nulle dans le rouissage en prairie ; c'est bien l'œuvre unique des organismes inférieurs.

II

ÉTUDE DU ROUISSAGE AU POINT DE VUE ANATOMIQUE ET CHIMIQUE

Les microbes et les moisissures produisent donc la dissociation des fibres textiles et leur séparation du cylindre ligneux central. Mais quelles sont les matières qu'ils attaquent pour arriver à ce résultat ?

Il existe toute une série de réactifs colorants permettant de différencier la cellulose et les corps pectiques : les safranines, le bleu de méthylène, le bleu de nuit, le bleu de naphthaline R en cristaux, réactifs si bien étudiés par Mangin ¹. La phénosafranine m'a donné d'excellents résultats. Elle colore en jaune orangé les corps pectiques, tandis qu'elle teint en rouge cerise les parois ligneuses et subérifiées.

Une coupe de lin non roui, traitée par ce réactif, montre des faisceaux fibreux peu colorés, noyés dans le parenchyme cortical coloré en jaune orangé, grâce à la présence de membranes ou prédominant des composés pectiques. Entre les fibres, la lamelle mitoyenne qui est également de nature pectique a la même coloration.

Au contraire, sur une coupe de lin roui, on voit les fibres séparées les unes des autres, par suite de la digestion des lamelles mitoyennes, et l'on constate la disparition des éléments parenchymateux de l'écorce.

Ces résultats de l'étude microscopique sont confirmés par l'analyse chimique. J'ai trouvé des quantités notables de corps pectiques dans des lins non rouis et il n'y en avait plus dans les lins rouis. Ce fait avait déjà été observé par Frémy. Le rouissage est donc bien une destruction de corps pectiques.

Ce fait établi, j'ai voulu examiner de plus près la fonction digestive des bactéries et des moisissures vis-à-vis des corps pectiques.

1. Recherches anatomiques sur la distribution des composés pectiques chez les végétaux, *Journal de Botanique*, 1893.

Cette partie de mon étude a été facilitée par M. le professeur Droixhe, qui a bien voulu me procurer des quantités assez considérables de pectine provenant de ses recherches sur les corps pectiques, et m'aider de ses conseils sur les propriétés de ces substances. Je lui en suis très reconnaissant.

J'ai constaté que les bactéries et les moisissures (*B. coli*, *B. fluorescens*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus niger* et *Penicillium glaucum*) se développaient dans des solutions de pectines ainsi composées :

Eau.....	1,000 c. c.
Pectine.....	10 grammes.
Peptone.....	1 —
Phosphate d'ammoniaque.....	1 —
Sulfate de potasse.....	0 ^{gr} ,5
— de magnésie.....	0 ^{gr} ,2

Les liquides ensemenés se sont troublés et j'ai constaté la disparition de la pectine par l'abaissement du degré polarimétrique. Ainsi une solution marquant 2,2° au polarimètre, avant l'ensemencement, ne marquait plus que 0,4° après 10 jours pour l'*Aspergillus niger* et 1,1°, pour le *Cladosporium herbarum*.

Il convient de remarquer que le niveau primitif des liquides avait été rétabli dans les tubes de culture, et que l'on avait tenu compte de la quantité de pectine retenue par le filtre Chamberland. Cette correction s'impose, car une solution marquant 2,5° polarimétriques avant filtration à la bougie de porcelaine n'en marque plus que 2,2° après.

Certes, ce procédé ne donne pas la quantité précise de pectine disparue, car il se forme sans doute d'autres composés pectiques dont le pouvoir polarisant est différent. Néanmoins, on ne peut mettre en doute la diminution totale des corps pectiques dans les liquides de culture.

La pectine libre est probablement très rare dans la nature; aussi, j'ai repris ces expériences sur ce que l'on est convenu d'appeler pectate de chaux, combinaison plus ou moins parfaite de pectine et de chaux.

Le même liquide minéral a été employé, et on l'a additionné de 1,2 0/0 de pectine dont on a provoqué la transformation en pectate de chaux, par addition d'une solution d'acétate de calcium à 15 0/0. C'est avec cette concentration de 1,2 0/0 que j'ai

obtenu les meilleurs résultats : une quantité moindre ne donne pas un milieu suffisamment ferme, pour y bien observer les progrès de la liquéfaction ; avec une dose plus forte, la gelée devient si compacte, que les microbes ne se développent pas, ou le font avec une extrême lenteur, à cause du pouvoir d'imbibition pour l'eau des corps pectiques.

Ce milieu de culture (acidifié pour les moisissures et alcalinisé pour les bactéries), devait être stérilisé avec les mêmes précautions qui ont été adoptées pour la stérilisation des tiges de lin. Les solutions de pectines chauffées à 120° précipitent mal par l'acétate de chaux, et les pectates de chaux bien denses, chauffées aux mêmes températures, se liquéfient partiellement. Pour éviter ces inconvénients, on a stérilisé à 110° les tubes contenant la solution pectique qui était ensuite précipitée par une solution d'acétate de calcium également stérilisée.

Les gelées de pectate de chaux ainsi obtenues ont étéensemencées avec les espèces suivantes :

Cladosporium herbarum, *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum*, *B. coli*, *B. fluorescens liquefaciens*, *B. subtilis* et *B. mesentericus*.

Tous ces organismes ont liquéfié la gelée ; l'action liquéfiante la plus rapide et la plus complète a été observée avec l'*Aspergillus* et le *Penicillium*, parmi les moisissures, et avec le *B. fluorescens* parmi les bactéries, celles-ci donnaient naissance à un léger dégagement gazeux pendant la liquéfaction. Il existe, comme on le sait, toute une série de corps pectiques assez mal définis et souvent difficiles à distinguer les uns des autres, série qui commence par la pectose, corps neutre et insoluble, et finit à l'acide méta-pectique, soluble et nettement acide et qui est le plus stable de tous.

Ce serait celui-ci qui se formerait par l'action microbienne, et Kolb prétend en avoir trouvé de grandes quantités dans les eaux de rouissage. Je ne suis pas parvenu à le caractériser dans les produits de l'action des microbes sur le pectate de chaux.

Le fait de la liquéfaction du pectate insoluble par les micro-organismes est donc prouvé. M. Winogradsky avait obtenu la même liquéfaction, mais beaucoup plus rapide, avec son ferment anaérobie du rouissage.

STATISTIQUE DE L'INSTITUT ANTIRABIQUE DE TUNIS

PAR LE D^r A. LOIR

L'Institut antirabique de Tunis a été ouvert le 15 juin 1894, il a donc plus de sept années d'existence. Il a été créé pour éviter aux personnes mordues, sur le territoire de la Régence, les inconvénients et les retards d'un voyage en France.

D'un autre côté, de nombreux Arabes des campagnes, surtout les femmes, refusaient de quitter la Régence, tandis qu'elles acceptent de venir à Tunis rechercher les bienfaits de la méthode pasteurienne.

Bien qu'il n'existe aucun document antérieur à la fondation de l'Institut Pasteur, relatant une statistique, la rage a été de tout temps une maladie fréquente et assez répandue en Tunisie. Ce qui en fait foi, c'est le nombre considérable de moyens mis en pratique par les indigènes pour guérir cette maladie. La superstition même attribue, à quelques marabouts, la faculté de prévenir la rage chez les mordus, et à l'eau de certains puits des qualités thérapeutiques à l'égard de cette maladie.

De tout temps, les toubibs (médecins arabes) se sont occupés de remédier à ce fléau et ont eu recours pour le faire aux panacées les plus extraordinaires.

La tête du chien mordeur carbonisée, pulvérisée et absorbée dans du vinaigre est un remède préconisé, ainsi que la fiente de chameau. A Gabès, le remède considéré comme le plus efficace par les indigènes est celui-ci : vingt-trois jours après la morsure, on fait absorber au blessé du bouillon fait avec de la viande d'un agneau d'un an, le poids d'un grain de blé d'une variété de coléoptère vésicant appelé dzermouth. Le malheureux ne tarde pas à uriner du sang dans lequel, au dire des Arabes, on retrouve sept petits vers qui seraient des embryons de chiens engendrés dans le corps humain par le virus. Ceux-ci une fois expulsés, le malade guérit.

Tous ces faits prouvent combien la rage est fréquente en Tunisie où elle se manifeste indifféremment, comme partout, en été et en hiver. Nous n'avons pas remarqué une fréquence plus

grande de la rage furieuse ou de la rage mue dans les différentes saisons.

Sur les 827 personnes soignées à l'Institut du 15 juin 1894 au 15 juin 1901, on trouve 287 Français, dont 88 soldats; 161 Italiens; 30 Maltais; 218 Arabes (hommes); 42 Arabes (femmes); 1 Grec; 6 Espagnols.

On compte 73 morsures à la tête, 468 aux mains, et 286 aux membres.

Les animaux mordeurs ont été : chiens 762, chats 39, chacals 2, ânes 2, chevaux 2, mulet 1, hommes 19.

Cette quantité anormale de personnes contagionnées par des hommes et qui sont venues se faire traiter s'explique par les usages d'une partie de la population tunisienne, les Siciliens, qui vont rendre visite au moribond, le chargent de commissions pour l'autre monde, l'embrassent et peuvent ainsi s'infecter.

Deux personnes ont été prises de la rage pendant le traitement, une autre est morte 10 jours après la fin du traitement. D'après les règles adoptées à l'Institut Pasteur de Paris, on ne doit pas compter ces trois décès dans le calcul de la mortalité; ne doivent y figurer, en effet, que les personnes prises de rage plus de 15 jours après le dernier traitement. Elles sont au nombre de 3.

Un homme est mort 11 mois après avoir subi les inoculations, un autre 3 mois et un troisième 4 mois après le traitement.

Sur les 827 personnes traitées, la mortalité est donc de 0,36 0/0, c'est-à-dire à peu près le chiffre de la mortalité donné par presque toutes les statistiques des différents Instituts Pasteur.

La statistique de ces 7 années nous montre la nécessité de l'application de la loi française qui veut que tout chien mordu, ou simplement roulé, par un chien enragé, soit immédiatement tué. Cette loi n'existe pas en Tunisie : aussi voit-on de véritables épidémies se produire à la suite de la morsure d'un chien enragé. Cet état de choses provient de ce que, au lieu de détruire les chiens mordus, on les met, dit-on, en observation. Or, le propriétaire de l'animal ne s'aperçoit jamais que son chien mis en observation offre des symptômes de rage. Le 2 décembre 1899, deux personnes mordues par un chien viennent de Kairouan pour se faire traiter. L'animal atteint de rage a mordu un autre chien. Celui-ci est mis en observation, disent ces personnes.

Le 24 janvier 1900 arrivent à l'Institut 2 nouveaux malades mordus par le second chien, en observation.

Le 6 décembre une autre personne se présente à l'Institut. Elle a été mordue par un chien qui en a mordu cinq autres qui sont aussi mis en observation. Enfin, le 17 janvier 3 personnes mordues par un de ces chiens en observation viennent demander les inoculations antirabiques. Voilà plusieurs personnes qui auraient été à l'abri de la contamination, si la loi qui veut que tout chien mordu par un chien enragé soit immédiatement abattu était en vigueur.

Le propriétaire d'un chien refuse toujours de reconnaître celui-ci pour suspect, et alors même qu'apparaissent des signes pouvant faire présumer l'hydrophobie, il ne veut pas les voir. Tout dernièrement nous avons été témoin du fait suivant. Un officier possédait deux chiens, qui ayant été roulés par un chien enragé, étaient en observation depuis un mois. Un jour, sur le point de sortir, il appela un de ses chiens à plusieurs reprises. Celui-ci n'obéit pas à l'appel de son maître qui, pour le punir, le cingla d'un léger coup de fouet. A son retour, au lieu de japper et d'accourir comme d'habitude, le chien restait immobile et abattu, et comme son maître s'approchait de lui pour le caresser, il le mordit à la main. Durant la nuit, éveillé par un bruit, sourd, il trouva le chien qui était tombé du fauteuil sur lequel il dormait habituellement; en le relevant, il fut mordu à l'autre main; le lendemain matin le chien fut trouvé mort, et ce ne fut que lorsque les mêmes symptômes se manifestèrent, 10 jours après, sur le second chien, et après l'avoir fait examiner par un vétérinaire qui reconnut la rage, qu'il vint se faire traiter à l'Institut Pasteur.

La petite épidémie suivante, survenue à Sousse, montrera combien les mesures sanitaires sont efficaces pour arrêter l'évolution de la rage.

Il a été traité à Tunis, venant de Sousse, 3 personnes en 1894, 4 en 1895, 2 en 1896, 16 en 1897 et enfin 41 en 1898. Le 9 février 1898 arrivent à Tunis 11 personnes qui ont été mordues à Sousse le 6 février par un chien enragé. Ce chien a mordu plusieurs autres chiens qui ont été tués, mais l'un d'eux, après être resté en observation pendant trois mois, est rendu à son maître et reprend sa place dans la maison.

Le 31 août, c'est-à-dire sept mois après qu'il avait été mordu, ce chien mord un enfant de neuf ans, fils de son maître; on le met en observation, la nuit il casse sa chaîne et mord dans la journée du 1^{er} septembre 5 personnes, dont 4 enfants. Enfin, on le reconnaît atteint de la rage. Voilà 6 personnes obligées de subir le traitement arabe. Je signale cette épidémie à l'administration : on prend des mesures et les mordus diminuent, puisque 6 personnes seulement viennent se faire traiter en 1899, 2 en 1900 et 7 en 1901. Souvent on signale la mort d'indigènes qui n'ont pas voulu venir se faire traiter; d'autres viennent pendant un jour ou deux, puis ne veulent plus continuer à subir les inoculations parce que, fidèles aux traditions dont nous avons parlé plus haut, ils ont été se plonger dans l'eau d'un puits célèbre par ses guérisons. On ne tarde pas à apprendre la mort de ces malheureux quelque temps après.

Deux musulmans des environs de Tunis vinrent se faire traiter en 1898. Ils subirent le traitement pendant 2 jours consécutifs, puis cessèrent de se présenter à l'Institut pour les inoculations. Je les fis avertir que le traitement n'était pas achevé; mais ils refusèrent de revenir s'y soumettre. L'un et l'autre moururent de la rage à 15 jours d'intervalle, 1 mois 1/2 après.

Les premières années, nous appliquions le traitement classique de Pasteur. Depuis 1896, nous faisons usage de la méthode préconisée par M. Calmette, nous conservons les moelles des lapins dans la glycérine; on peut, grâce à cette méthode, faire seulement trois séries de lapins par mois. Nous n'avons pas constaté de différence dans les résultats obtenus par l'application de ce traitement.

Nous pouvons ajouter que pendant ces 7 années nous n'avons pas eu un seul abcès sur les personnes inoculées.

En faisant des recherches relatives à l'action de la glycérine neutre stérilisée sur le virus fixe de la rage et sur ce même virus à ses différents degrés d'atténuation, nous avons constaté que les cerveaux rabiques, conservés entiers dans 20 grammes de glycérine, à 30° et à une température de 10 à 15°, ne s'atténuent pas d'une manière progressive, comme on pourrait le croire. La virulence disparaît subitement, au bout d'une période qui n'a jamais dépassé 2 mois 1/2 dans nos expériences.

Avec des émulsions de cerveaux qui avaient ainsi perdu leur virulence ayant été conservés de 4 mois à 2 mois $1/2$ dans la glycérine et ne donnaient plus la rage par trépanation, nous avons inoculé, sous la peau, tous les 8 jours, plusieurs séries de lapins chaque fois, avec 4 c. c. d'une émulsion épaisse. Les inoculations ont été faites pendant 3 mois, sans amener aucun accident, puis ces lapins ont été trépanés avec du virus fixe et sont morts avec un retard moyen de 48 heures sur les témoins.

L'INSTITUT ANTIRABIQUE DE LA VILLE DE BORDEAUX

PAR LE D^r G. FERRÉ.

Professeur à la faculté de médecine de Bordeaux.

I

L'institut antirabique de la ville de Bordeaux a été fondé par la municipalité bordelaise en 1900 : cette dernière pourvoit à son entretien avec subvention du département de la Gironde. Il fonctionne sous ma direction avec l'aide de M. le D^r Buard.

Dès le 1^{er} mai 1900, les inoculations antirabiques auraient pu y être pratiquées, mais la première personne à traiter ne s'est présentée que le 19 mai. Le nombre des personnes traitées pendant la première année du fonctionnement, c'est-à-dire du 19 mai 1900 au 18 mai 1901, a été exactement de 100.

Je grouperai les résultats obtenus dans un tableau semblable à celui que publie périodiquement l'Institut Pasteur.

Voici ce tableau :

	TÊTE			MAINS			MEMBRES			TOTAUX		
	Traités.	Morts.	Mortalité.	Traités.	Morts.	Mortalité.	Traités.	Morts.	Mortalité.	Traités.	Morts.	Mortalité.
Tableau A.....	4	0	0	15	0	0	12	0	0	28	0	0
Tableau B.....	4	0	0	16	0	0	5	0	0	25	0	0
Tableau C.....	3	0	0	30	0	0	14	0	0	47	0	0
	8	0	0	61	0	0	31	0	0	100	0	0

La mortalité est de 0.

II

Les personnes mordues sont venues de la région du Sud-Ouest.

La Gironde en a fourni 45; le Lot-et-Garonne, 14; la Charente, 12; la Charente-Inférieure, 3; les Basses-Pyrénées, 10; les Landes, 5; le Gers, 6; la Dordogne, 2; le Lot, 2; le Tarn-et-Garonne, 1.

Le traitement a été commencé : 1 jour après la morsure, 6 fois; 2 jours après, 9 fois; 3 jours après, 15 fois; 4 jours après, 8 fois; 5 jours après, 25 fois; 6 jours après, 5 fois; 7 jours et plus, 27 fois; 10 jours et plus, 7 fois; plus de 15 jours après, 8 fois.

Parmi les animaux mordeurs nous comptons 88 chiens, 10 chats, 1 porc et 1 lapin.

Le traitement est absolument identique à celui qui se pratique à l'Institut Pasteur.

Je signalerai une innovation qui offre des avantages réels : les chiens mordeurs, les chiens suspects sont amenés par la police dans les chenils de l'Institut antirabique où ils sont mis en surveillance pendant le laps de temps voulu.

Je suis heureux, en terminant, de rendre hommage à la bienveillance de l'Institut Pasteur qui a recommandé, toutes les fois qu'il a pu le faire, aux personnes mordues de notre région de venir se faire traiter à Bordeaux.